UNIVERSITÉ DE PARIS - FACULTÉ DE PHARMACIE

RECHERCHES SUR LES GALACTOSIDES DU SACCHAROSE DANS LES RACINES DES CARYOPHYLLACEES

THÈSE

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

(Pharmacie)

Présentée par **Utako ARIYOSHI**

Pharmacien

Attachée de Recherches au Centre National de la Recherche Scientifique,
Ex-Assistante à l'Institut des Maladies Infectieuses de l'Université de Tokio

Soutenue le **1961, devant la Commission d'examen**

Jury { MM. J. E. COURTOIS, Président
P. MALANGEAU, Professeur
P. DELAVEAU, Maître de Conférences

DACTYLO-SORBONNE
8, Rue Casimir-Delavigne
PARIS-VI^e^
1961

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41538122_0022

UNIVERSITÉ DE PARIS - FACULTÉ DE PHARMACIE

RECHERCHES SUR LES GALACTOSIDES DU SACCHAROSE DANS LES RACINES DES CARYOPHYLLACEES

THÈSE

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

(Pharmacie)

Présentée par **Utako ARIYOSHI**

Pharmacien

Attachée de Recherches au Centre National de la Recherche Scientifique,

Ex-Assistante à l'Institut des Maladies Infectieuses de l'Université de Tokio

Soutenue le **1961, devant la Commission d'examen**

Jury { MM. J. E. COURTOIS, Président
P. MALANGEAU, Professeur
P. DELAVEAU, Maître de Conférences

DACTYLO-SORBONNE

8, Rue Casimir-Delavigne

PARIS-VI^e^

1961

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

PERSONNEL DE LA FACULTE DE PHARMACIE DE PARIS

ADMINISTRATION

M. G. VALETTE, Doyen
MM. JANOT, Assesseur, G. CUVIER, Secrétaire Général
M. L. JEANDEL, Secrétaire Général-Adjoint
Mme S. CERTAIN, Secrétaire
Mme M.L. ESPINASSE, Secrétaire

DOYEN HONORAIRE

M. René FABRE, Membre de l'Institut.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. René FABRE, Membre de l'Institut, DELEPINE, Membre de l'Institut, LAUNOY, FLEURY, MASCRE, PICON, BEDEL.

PROFESSEURS

MM.	M.M. JANOT	Pharmacie Galénique (T.)
	G. VALETTE	Pharmacodynamie (T.)
	R. PARIS	Histoire naturelle des médicaments simples d'origine végétale (T.)
	M. GUILLOT	Physique (T.)
	J. GAUTIER	Chimie organique (T.)
Melle	S. LAMBIN	Microbiologie (T.)
MM.	Y. RAOUL	Zoologie appliquée (T.)
	J. COURTOIS	Chimie biologique (T.)
	L. DOMANGE	Chimie minérale (T.)
	P. CRETE	Botanique (T.)
	R. TRUHAUT	Toxicologie et Hygiène industrielle (T.)
	A. MORETTE	Hydrologie (T.)
	R. CAVIER	Parasitologie (T.)
	A. QUEVAUVILLER	Hygiène (T.)
	R. MOREAU	Pharmacie chimique (T.)
	J. GUY	Mathématiques appliquées aux sciences physiques et biologiques (T.P.)
	A. GERMAN	Virologie et Sérologie (T.P.)
	M. PIETTE	Biologie sanguine (T.P.)
	P. MALANGEAU	Chimie analytique (T.)
	M. GIRARD	Chimie appliquée à l'expertise (T.)
	G. DILLEMAN	Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie (T.)

	G. DEYSSON	Professeur sans chaire
	J. FLAHAUT	" "
	A. LE HIR	" "
	J. RENAULT	" "

MAITRES DE CONFERENCES

MM.	P. LARUELLE	Physique
	G. Le MOAN	Toxicologie
	P. ROSSIGNOL	Pharmacodynamie
	H. RENAULT	Pharmacie chimique
	G. PAOLETTI	Radioisotopes - Applications à la Biologie et à la Pharmacie
	A. MANGEOT	Chimie analytique
	P. DELAVEAU	Biologie végétale
	C. BOUDENE	Toxicologie et Hygiène industrielle
	A. DESVIGNES	Microbiologie
	F. PERCHERON	Biochimie
	J.N. SAVEL	Sciences Naturelles
	P. REYNAUD	Sciences Physico-chimiques
	N.....	Sciences Naturelles

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

MM.	J. BORY	Sérologie
	P. CORRIEZ	Physique
	J. DUCHENNE	Microbiologie
	J. GARDENT	Chimie analytique - 1ère année -
	P. GESTEAU	Physique biologique
	J. HARISPE	Chimie générale et pharmaceutique
	J. HENRY	Chimie (4ème année)
	M. LECLERC	Chimie biologique
	M. LEMONNIER	Chimie analytique (2ème et 3ème années)
Melle	S. LONGUEVALLE	Service des examens de chimie
MM.	P. PELLERIN	Chimie analytique (2ème et 3ème années)
	R. POTTIER	Pharmacie Galénique industrielle
	P. POULLAIN	Hématologie
Melle	A. ROLLEN	Biologie végétale
M.	N.....	Parasitologie

INSTITUT DE PHARMACOTECHNIE ET DE PHARMACODYNAMIE

M.	A. CAVE	Chef de travaux de Pharmacotechnie galénique
Melle	H. MORIN	Chef de travaux de pharmacodynamie
M.	ROBBA	Chef de travaux de Pharmacotechnie chimique

BIBLIOTHEQUE

M.	GARNIER	Conservateur, chargé de la Direction
Melle	LAVAUD	Conservateur
Mme	DESGRIPPES	Bibliothécaire
Mme	KREHMER	Bibliothécaire

-:-

A Monsieur le Professeur P. FLEURY,

Membre de l'Académie Nationale de Médecine,
Professeur Honoraire à la Faculté de Pharmacie de Paris,
Officier de la Légion d'Honneur,

Qui nous a toujours honorée
de son bienveillant intérêt,

En témoignage de notre respectueuse gratitude.

A Monsieur le Professeur J.E. COURTOIS,

Professeur de Chimie Biologique à la Faculté de Pharmacie de Paris,
Pharmacien des Hôpitaux de Paris,
Chevalier de la Légion d'Honneur,

Qui nous a fait le grand honneur
de nous associer à quelques-
unes de ses nombreuses recherches, de diriger nos travaux
et de présider notre jury de
thèse,

En témoignage de notre profonde
reconnaissance.

A Monsieur le Professeur P. MALANGEAU,

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris,
Pharmacien-Chef des Hôpitaux psychiatriques,
de la Seine,

Qui nous a fait l'honneur de
juger ce travail,

En témoignage de notre sincère
et déférente reconnaissance.

A Monsieur le Professeur P. DELAVEAU,

Maître de Conférences,

Qui a bien voulu faire partie
de notre jury de thèse,

Avec l'expression de notre
respectueuse gratitude.

A Messieurs les Professeurs de
l'Institut des Maladies Infectieuses
de l'Université de Tokio

Hommage de respectueuse gratitude

A mes Parents,

A ma Famille,

A mes Amis.

RECHERCHES SUR LES GALACTOSIDES DU SACCHAROSE DANS LES RACINES DES CARYOPHYLLACEES

-:-

INTRODUCTION

-:-

Depuis le début de ce siècle, de nombreuses tentatives ont été faites en vue de rechercher et d'identifier les holosides et les polyholosides présents chez les Végétaux. (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12)

Jusqu'à présent, un certain nombre de galactosides du saccharose ont été isolés.

D'une façon générale, tous ces corps sont dextrogyres, non réducteurs, de formule générale :

$$(\text{Glucose})^1 - (\text{fructose})^1 - (\text{galactose})^n, \text{ où } n = 1 \text{ à } 6$$

Le glucose et le fructose y sont associés comme dans le saccharose. Les molécules de galactose sont rattachées soit à la fraction glucopyranose, soit à la fraction fructofuranose du saccharose.

On peut classer les galactosides du saccharose en plusieurs groupes selon la nature des liaisons autres que celle qui unit le fructose au glucose.

I - Trisaccharides

A - Raffinose : La structure est celle d'un
α D galactopyranosyl (1 → 6) α D glucopyranosyl (1 → 2)
β D fructofuranoside (13) (14) (15) (16) (17) (18).

B - Plantéose : La structure est celle d'un α D glucopyranosyl (1 → 2) β D fructofuranosyl (6 → 1) α D galactopyranoside (19) (20) (21) (22) (23).

C - Umbelliférose : La structure est celle d'un
α D galactopyranosyl (1 → 2) α D glucopyranosyl (1 → 2)
β D fructofuranoside (24) (25) (26).

II - Oligosaccharides dérivant du raffinose par adjonction de molécules de galactose à l'extrémité galactose (série du stachyose). Stachyose (28) (29) (30) (31) (32), Verbascose (33) (34) (35), Ajugose (36) (37) (38) (39).
Pentagalactosidosaccharose (2) (38) (39)
Hexagalactosidosaccharose (2)

Tous ces saccharides présentent la structure générale :
$(\alpha$ D galactopyranosyl $(1 \rightarrow 6))^n \alpha$ D galactopyranosyl $(1 \rightarrow 6)$
α D glucopyranosyl $(1 \rightarrow 2)$ β D fructofuranoside
où n = 1 à 6.

III - Oligosaccharides derivant du raffinose par adjonction de molécules de galactose à l'extrémité fructose (Série du lychnose et de l'isolychnose)

La structure du lychnose est celle d'un α D galactopyranosyl $(1 \rightarrow 6)$ α D glucopyranosyl $(1 \rightarrow 2)$ β D fructofuranosyl $(1 \rightarrow 1)$ α D galactopyranoside.

L'isolychnose n'en diffère que par une liaison $(3 \rightarrow 1)$ au lieu de $(1 \rightarrow 1)$ entre fructose et galactose.

COURTOIS et ses coll. ont isolé ces Oligosaccharides à partir de racines de Lychnis dioïca et déterminé les structures de ces corps (Tétra à Heptasaccharides).

Nous nous sommes proposée de rechercher si les Oligosaccharides analogues à ceux du Lychnis dioïca se retrouvaient dans d'autres plantes de la même tribu des Silénees, de la famille des Caryophyllacées.

Dans la première partie de cette thèse, nous avons exposé les généralités sur les Oligosaccharides du Lychnis dioïca, ainsi que l'ensemble des techniques utilisees pour l'isolement, la purification et la caractérisation des Oligosaccharides.

Dans une deuxième partie, nous avons appliqué les techniques précédemment décrites aux Oligosaccharides isolés à partir des racines de Cucubalus baccifer et déterminé les structures de ces corps.

Dans une troisième partie, nous avons étudié les structures des Oligosaccharides présents dans les racines de Dianthus caryophyllus var. blanche et var. rouge. Les Oligosaccharides isolés de ces deux espèces de Végetaux sont identiques à ceux qui ont été décrits à partir du Lychnis dioïca. Nous avons caracterisé en outre des tri et octosaccharides du même groupe et qui n'avaient pas été décelés jusqu'ici à l'etat naturel.

Avant d'exposer les résultats de ce travail, qu'il nous soit permis de témoigner notre profonde gratitude à notre Maître, Monsieur le Professeur J.E. COURTOIS, qui nous a accueillie au laboratoire de Chimie-Biologique. Son extrême bienveillance nous a permis de préparer cette thèse en profitant journellement de sa vaste expérience scientifique et de ses nombreux encouragements. Nous lui exprimons notre profond attachement et notre respectueuse reconnaissance pour le grand honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider le jury de cette thèse.

Monsieur le Professeur P. FLEURY nous a encouragée par des conseils toujours stimulants. Nous tenons à lui exprimer notre respectueuse gratitude.

Monsieur le Professeur P. MALANGEAU a bien voulu faire partie de notre jury. Nous le prions de croire à notre reconnaissance respectueuse.

Nous adressons également nos remerciements à Monsieur le Professeur P. DELAVEAU qui fait partie de notre jury de thèse.

Monsieur R. DEDONDER, Maître de Recherches au C.N.R.S. et Directeur du laboratoire des polyosides à l'Institut Pasteur, a bien voulu accepter d'être notre parrain au C.N.R.S. Nous lui adressons nos respectueux remerciements.

Monsieur F. PERCHERON, Chargé de cours, nous a apporté les deux échantillons de Dianthus caryophyllus var. blanche et var. rouge de Brévannes ; il a suivi avec intérêt nos recherches. Nous lui exprimons notre respectueuse reconnaissance.

A Monsieur FARGEAS, Aide-technique principal au Museum National d'Histoire Naturelle, qui nous a récolté les deux échantillons du Cucubalus baccifer, nous exprimons notre gratitude.

Enfin, nous adressons à tous nos camarades du laboratoire nos affectueux remerciements pour leur esprit d'entr'aide et leur constante amabilité à notre égard.

-:-

PREMIERE PARTIE

-:-

CHAPITRE I

GENERALITES SUR LES OLIGOSACCHARIDES DES LYCHNIS DIOICA

-:-

En 1884, A. MEYER (40) isola des racines d'une Caryophyllacée, le Melandrium album, un composé hydrocarboné qu'il dénomma lactosine, car il renfermait du galactose et du glucose.

En 1935, NETIEN (41) décela l'existence de proportions assez abondantes de saccharides analogues à la lactosine dans diverses Caryophyllacées ; il montra qu'il s'agissait probablement d'un mélange d'oligosaccharides dont la composition évolue au cours de la végétation mais il ne put réussir à les fractionner par les techniques classiques avant l'introduction de la chromatographie sur colonne.

En 1956, COURTOIS, ARCHAMBAULT, WICKSTRÖM et Le DIZET (42) (43) (44) (45) (46) (47) ont constaté que la lactosine des racines de Lychnis dioïca était un mélange de galactosides du saccharose dérivant de deux tétrasaccharides isomères. Ils ont proposé de les dénommer Lychnose (I) et isolychnose (II). Ils libèrent par hydrolyse totale 2 mol. de galactose, une de glucose et une de fructose.

Le glucose et le fructose sont réunis comme dans le saccharose isolé après élimination de deux molécules de galactose par l'α - galactosidase.

L'acide sulfurique 0,4 N à 37° rompt assez sélectivement (Tableau I) la liaison fructofuranosidique et scinde les saccharides en α-galactosido (1 → 6) glucose (mélibiose) d'une part et

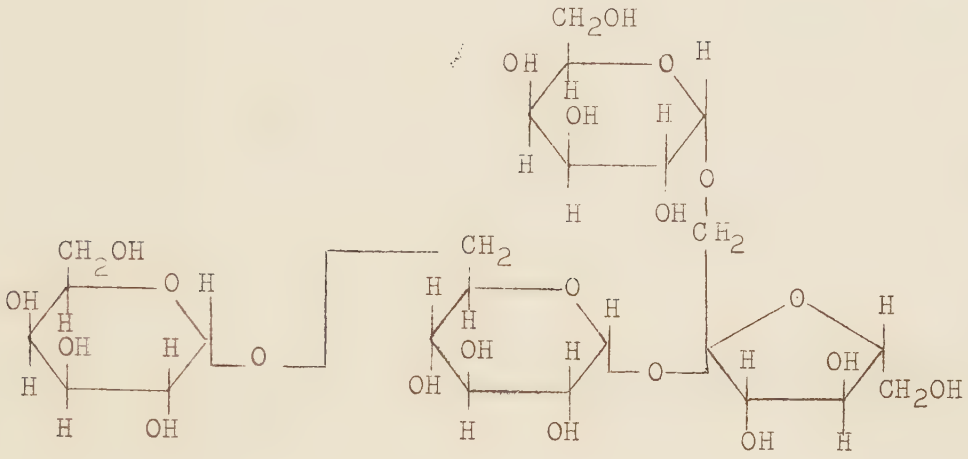
en galactosidofructose d'autre part ; ce dernier est hydrolysé par l'acide sulfurique dilué ou l'α-galactosidase du Café en une mol. de galactose et une de fructose (Tableau II). Le corps obtenu a une mobilité chromatographique assez voisine mais nettement distincte de celle du plantéobiose (α-galactosido 1 → 6 fructose). Les deux galactosides du fructose se différencient en outre par les modalités de leur oxydation par l'acide periodique.

Le lychnose (I) renfermant de faibles quantités d'isolychnose (II) fut soumis à une méthylation complète puis hydrolysé par l'acide sulfurique N/1. Les oses méthylés furent séparés par chromatographie sur colonne et identifiés respectivement 1) au tétraméthyl, 2, 3, 4, 6 - galactose 2) au triméthyl, 2, 3, 4 glucose, 3) au triméthyl, 3, 4, 6 fructose et 4) au triméthyl, 1, 4, 6 fructose.

Les quantités d'acide periodique réduit et d'acide formique libéré par cette oxydation permettent de considérer que la structure du lychnose (I) est celle d'un α D galactopyranosyl (1 → 6) α D glucopyranosyl (1 → 2) β D fructofuranosyl (1 → 1) α D galactopyranoside. L'isolychnose (II) n'en diffère que par une liaison (3 → 1) au lieu de (1 → 1) entre fructose et galactose.

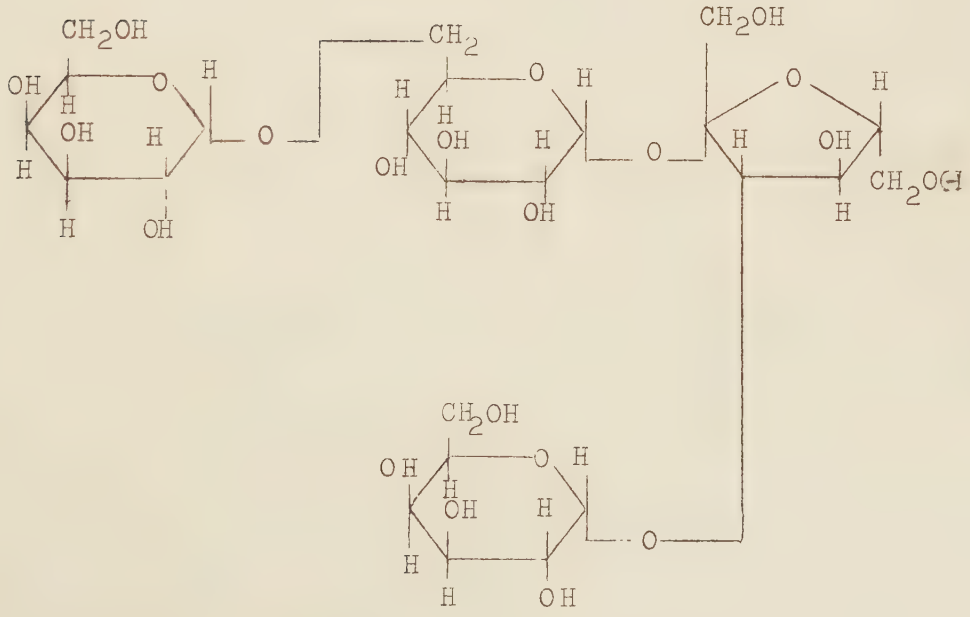
SCHEMA I

LYCHNOSE



SCHEMA II

ISOLYCHNOSE

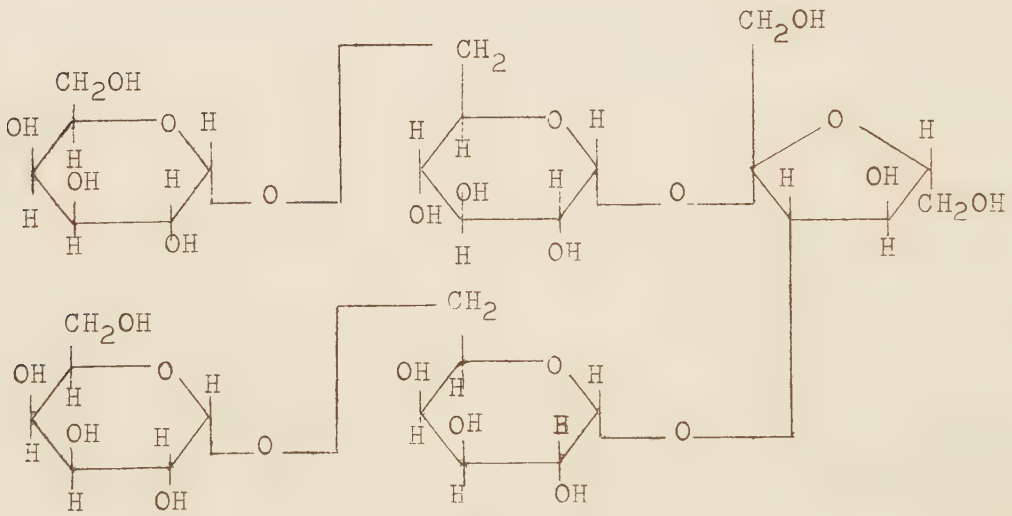


Les proportions respectives des deux séries de saccharides varient au cours de la végétation.

Des racines d'automne ont permis d'isoler un pentasaccharide (IV) et un hexasaccharide dérivant du lychnose par adjonction d'une ou deux mol. d'α -galactose reliées au galactose uni au fructose dans le lychnose. Les molécules de galactose sont associées entre elles par des liaisons (1 → 6).

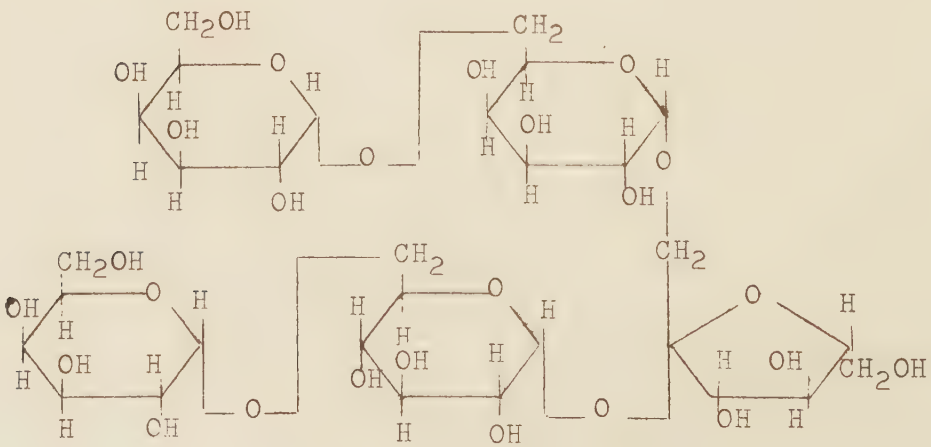
SCHEMA III

PENTASACCHARIDE DE LA SERIE DE L'ISOLYCHNOSE



SCHEMA IV

PENTASACCHARIDE DE LA SERIE DU LYCHNOSE



Les racines récoltées en juin renferment des penta- et hexasaccharides où prédominent très largement les dérivés de l'isolychnose ; enfin à partir des racines récoltées en avril, il a été possible d'isoler (45) (46) un heptasaccharide dérivant de l'isolychnose.

Dans ces différents corps, les molécules supplémentaires de galactose sont reliées en (1 → 6) ; il n'a pu encore être prouvé avec certitude que la chaîne d'unités galactose se développe à partir du galactose uni au fructose de l'isolychnose.

Dans une étude sur les racines de Silene inflata , ARCHAMBAULT (16) mit en évidence par chromatographie sur papier des oligosaccharides migrant comme ceux du lychnose.

Par la suite, COURTOIS, DAVY et Le DIZET (recherches non publiées) ont séparé les oligosaccharides du Silene ; ces corps dont l'analyse est terminée font partie des séries du lychnose et de l'isolychnose (I) et (II).

Parallèlement à ces recherches, nous avons entrepris l'étude des racines d'une autre plante de la tribu des Silénées : Cucubalus baccifer (47). Nous avons réussi à isoler les mêmes fractions de saccharides de deux lots de racines récoltés l'un en mai 1957, l'autre en avril 1959 :
Un mélange des deux isomères dérivant respectivement du lychnose et de l'isolychnose (I) et (II). Les deux lots de racines diffèrent légèrement par les tri et tétrasaccharides isolés. Comme trisaccharide les racines de 1957 n'ont permis de séparer que du raffinose ; celles de 1959 contiennent en outre deux trisaccharides (VIII) et (IX) dérivant respectivement du lychnose et de l'isolychnose par élimination du galactose relié au glucose.

L'étude que nous avons entreprise des racines de Cucubalus baccifer prouve qu'il est possible d'obtenir directement à partir des Végétaux ce même trisaccharide.

COURTOIS, Le DIZET et PETEK (48) avaient obtenu un de ces trisaccharides (VIII) et (IX) en traitant par l'α -galactosidase

un mélange de penta- et hexasaccharides isolé des racines de Lychnis dioïca récoltées en juin. Ce trisaccharide a été séparé et identifié au corps (VIII) :
α D glucopyranosyl (1 → 2) β D fructofuranosyl (3 → 1)
α D galactopyranoside, c'est-à-dire un monogalactoside du saccharose appartenant à la série de l'isolychnose (II).

Les racines de 1957 ont permis d'isoler un mélange de lychnose et isolychnose auxquels s'adjoint, dans le lot 1959, du stachyose.

Nous avons ainsi pu montrer que dans les penta -, hexa -, hepta - et octosaccharides (X) et (XI), les molécules supplémentaires se relient en (1 → 6) dans une chaîne débutant par le fructose.

Les nonasaccharides ont été décelés par chromatographie sur papier, mais sans qu'on puisse les isoler en raison de leur faible concentration.

HATANAKA (49) a proposé le nom de sésamose pour un tétrasaccharide présent dans les graines de Sesamum indicum (Pédaliacées). Le sésamose y est associé à un isomère qui est probablement le lychnose (I).

Par la suite nous avons entrepris l'étude des racines d'une autre plante ;
Dianthus Caryophyllus var. rouge et var. blanche.
A partir de racines recoltées en novembre 1959, nous avons isolé un mélange de tri-(VIII) et (IX), tétra - (I) et (II), penta -(III) (IV) hexa - , hepta - et octosaccharides (X) et (XI) dont nous avons réussi à déterminer les structures. Chacune des fractions de saccharides est un mélange de deux isomères dérivant respectivement du lychnose et de l'isolychnose.

Ces galactosides du saccharose ont la structure générale suivante :

$$\left[\alpha\ \underline{D}\ \text{galactopyrasosyl}\ (1 \rightarrow 6)\right]^{n}\ \alpha\ \underline{D}\ \text{glucopyranosyl}\ (1 \rightarrow 2)\ \beta\ \underline{D}\ \text{fructofuranosyl}\ (x \rightarrow 1)\left[\alpha\ \underline{D}\ \text{galactopyranosyl}\ (6 \rightarrow 1)\right]^{n'}\ \alpha\ \underline{D}\ \text{galactopyranoside.}$$

Trisaccharides	n = 0
Tetra-, Penta-, hexa-, hepta- et octosaccharides	n = 1
Tri- et tétrasaccharides	n' = 0
Pentasaccharides	n' = 1
Hexasaccharides	n' = 2
Heptasaccharides	n' = 3
Octosaccharides	n' = 4
Série du lychnose	x = 1
Série de l'isolychnose	x = 3

-:-

CHAPITRE II

-:-

TECHNIQUES GENERALES

-:-

Pour l'étude de chaque plante, nous avons systématiquement procédé de la façon suivante :

I - ISOLEMENT ET PURIFICATION DES HOLOSIDES

Aussitôt après leur récolte, les racines sont nettoyées, lavées, essuyées.

1 kg de racines est traité par 3 fois son poids d'alcool à 70° préalablement additionné de 4 g par litre de carbonate de calcium.

Nous portons à l'ebullition pendant 2 heures sous réfrigérant à reflux. Les racines sont collectées, coupées en petits tronçons et épuisées par l'alcool bouillant ; les fragments sont alors broyés et soumis à un épuisement alcoolique. Les extraits alcooliques sont réunis et concentrés par distillation sous pression réduite à l'évaporateur rotatif jusqu'au 1/5 de leur volume.

Nous déféquons ensuite par l'acétate basique de plomb, filtrons, éliminons la majeure partie du plomb dans le filtrat en acidifiant par l'acide sulfurique ; nous neutralisons par le carbonate de baryum, filtrons et concentrons sous vide jusqu'à l'état visqueux.

Le sirop obtenu est trituré avec de la baryte hydratée, puis additionné de trois volumes d'alcool à 95°.

La masse contenant les saccharides précipités à l'état de combinaisons barytiques est recueillie et décomposée par l'acide sulfurique dilué à la température du laboratoire ; puis nous neutralisons immédiatement par le carbonate de baryum et filtrons ; nous concentrons jusqu'à consistance sirupeuse par distillation sous vide à 50° ; par addition de 4 volumes d'alcool à 95°, il apparaît un précipité blanc amorphe qui est recueilli.

Le filtrat est concentré jusqu'à consistance sirupeuse par distillation sous vide à 50° ; la chromatographie sur papier indique dans ce filtrat la présence de mono-, di-, et trisaccharides et une faible quantité de tétrasaccharides.

2 - FRACTIONNEMENT PAR PASSAGE SUR COLONNE DE CHARBON ET PAR CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

Les corps présents dans la fraction soluble dans l'alcool ont été séparés par chromatographie sur papier comme ceux présents dans le précipité, mais cette opération a nécessité un premier fractionnement sur charbon pour éliminer les saponines.

La solution aqueuse du précipité est introduite sur une colonne de charbon de 1,30 m de hauteur et 5 cm de diamètre. Une première élution par l'eau distillée fait apparaître les monosaccharides ; un traitement par l'eau additionnée de 3 puis 5 p.100 d'alcool permet de recueillir les di- et trisaccharides ; les alcools à 9 et 10 p.100 éluent les tri- et tétrasaccharides ; les alcools à 15 et 20 p.100 éluent les homologues supérieurs, ces homologues sortant associés par trois ou quatre dans chacune des fractions.

D'autres tentatives de fractionnements sur colonne ayant échoué, nous avons dû assurer la séparation definitive sur feuilles de papier Arches 304 par chromatographie descendante avec les mélanges solvants : n-butanol : 9/pyridine : 5/ eau : 4 en vol. pour la séparation des di- et trisaccharides ; n. butanol : 4/ eau : 4/ acétate d'éthyle : 3/ acide acétique glacial : 2,5 en vol ; pour la séparation des homologues supérieurs.

Les bandes correspondant à chaque saccharide sont découpées, extraites deux fois par l'eau froide, puis une fois par l'eau à 50°. La solution obtenue est concentrée sous vide, chauffée 15 minutes au bain-marie avec du charbon actif qui retient les impuretés extraites du papier et les dernières traces de saponines.

Le corps obtenu est à nouveau repurifié dans les mêmes conditions par chromatographie sur papier puis élution, cette opération étant répétée une troisième fois si nécessaire.

La solution contenant le saccharide est finalement évaporée à sec et conservée dans un dessicateur contenant de l'anhydride phosphorique. Ces opérations ont permis de séparer nettement les fractions différant par leur teneur en galactose ; par contre, dans le cas des mélanges de saccharides isomères, la méthode décrite préoédemment n'a pas permis de séparer de façon satisfaisante les dérivés du lychnose de ceux de l'isolychnose.

C'est pourquoi il nous a semblé préférable d'utiliser les techniques de méthylation et d'oxydation periodique pour les mélanges des deux isomères.

-:-

CHAPITRE III

-:-

TECHNIQUES D'ANALYSE

-:-

Pour caractériser les oligosaccharides isolés des racines de Végétaux, nous avons utilisé les techniques d'analyse basées sur les propriétés physiques et chimiques suivantes :

I - MOBILITE PAR CHROMATOGRAPHIE

Nous avons comparé la vitesse de migration de chacun des saccharides à celle du raffinose (R_{raf}) en utilisant un papier Arches 304, en chromatographie descendante avec le mélange solvant suivant :

n-Butanol	4	en vol.
Eau	4	
Acétate d'éthyle	3	
Acide acétique glacial	2,5	

Durée de développement : 3 jours, température : 18°.

Le chromatogramme est révélé avec le révélateur suivant :

β-Naphtylamine	0,1 g
Thymol	1,0 g
Acide orthophosphorique	2 ml
Ethanol à 80°	Q S. pour obtenir 150 ml.

Dans ces conditions, un chauffage à 105° pendant 5 minutes fait apparaître pour les pentoses, une coloration rose ; le fructose donne une teinte jaune clair, très nette et les holosides

renfermant du fructofuranose se colorent en jaune citron ; le glucose, le galactose et les holosides ne contenant que des aldohexoses dans leur molécule donnent des taches marron.

2 - POUVOIR REDUCTEUR

Nous avons mis en évidence le pouvoir réducteur des saccharides en utilisant la micro méthode au réactif cupro-alcalin selon le protocole opératoire de NELSON (50), avec la modification de SOMOGYI (51).

3 - POUVOIR ROTATOIRE

Mesuré sur les corps en solution aqueuse : nous opérons avec des oligosaccharides soigneusement purifiés, séchés jusqu'à poids constant en employant un microdessiccateur permettant l'élimination de toute trace d'humidité à la température de 100-110°, sous vide en présence d'anhydride phosphorique. Les mesures sont effectuées à l'aide du Polarimètre-Laurent, raie D.

4 - HYDROLYSE ACIDE TOTALE ET DOSAGE DES OSES LIBERES

Une petite quantité (20 mg à 30 mg) de saccharide est dissoute dans l'acide sulfurique N/1 (2 ml). La solution introduite dans une ampoule scellée est hydrolysée par chauffage de 3 heures au bain-marie bouillant. L'hydrolysat est neutralisé par le carbonate de baryum, puis centrifugé. Le liquide surnageant est soumis à la chromatographie descendante sur papier Whatman N°1 avec le solvant :

n-Butanol : 9 / Pyridine : 5 / Eau : 4 en vol.

Nous constatons la présence de galactose, de glucose et de fructose ; nous découpons les bandes horizontales correspondant à chacun de ces sucres. L'élution des papiers est faite par l'éthanol à 50 p.100 selon une technique sensiblement identique à celle de LAIDLOW et REID (52).

Les oses élués sont dosés par la microméthode de NELSON-SOMOGYI (50) (51).

Nous établissons une courbe de référence avec chacun des oses à doser. Le principal but de ce dosage est la détermination du rapport moléculaire galactose/glucose : au cours de l'hydrolyse acide totale, il y a toujours destruction d'une partie de fructose ; avec tous les galactosides du saccharose soumis à une hydrolyse acide totale, le rapport moléculaire glucose/fructose est supérieur à 1.0 (1.10 à 1.3 selon les cas) par suite de la destruction du fructose.

5 - HYDROLYSE ACIDE PARTIELLE

Il est bien connu que les liaisons furanosidiques sont plus aisément hydrolysables par les acides que les liaisons pyranosidiques. C'est ainsi que le raffinose est scindé en fructose et mélibiose, le stachyose en fructose et manninotriose par hydrolyse de courte durée dans les acides dilués (Tableau I). Dans les araboxylanes, le L arabinose est à l'état de furanoside et le D xylose à l'état de pyranoside ; une hydrolyse acide modérée détache l'arabinose et laisse intacte la xylane. Nous avons suivi le protocole opératoire établi par FRENCH et coll. (20) pour rompre sélectivement la liaison fructofuranosidique du plantéose scindé en glucose et plantéobiose : chauffage de 48 heures à 37° dans l'acide sulfurique 0.4 N. Nous opérons sur une prise d'essai de 20 mg d'oligosaccharides avec 0,5 ml d'acide sulfurique 0.4 N.

L'hydrolysat est neutralisé par le carbonate de baryum, puis centrifugé ; le liquide surnageant est soumis à la chromatographie descendante sur papier avec le solvant acide déjà indiqué (p. 17). Les chromatogrammes sont révélés soit par la β-naphtylamine et le thymol (p. 17), soit par l'urée chlorhydrique pour les cétoses. Ce dernier réactif a la composition suivante :

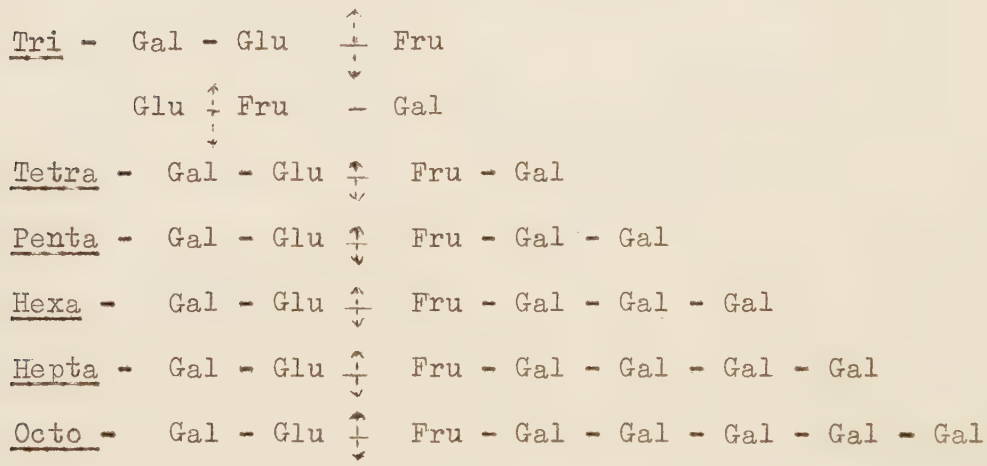
(Urée : 5 g
)
(Acide chlorhydrique 2 N : 20 ml
) Ethanol à 80° : 80 ml

Pulvérisation puis chauffage à 105°.

Les cétoses et saccharides renfermant des cétoses fournissent des colorations s'étageant du gris clair au vert.

TABLEAU I

MODE D'ACTION DE L'ACIDE SULFURIQUE 0.4 N à 37° SCINDANT LA LIAISON FRUCTOFURANOSIDIQUE



L'hydrolyse partielle est d'autant moins spécifique que le poids moléculaire du saccharide augmente. Ceci n'est pas surprenant puisque le nombre de liaisons pyranosidiques augmente.

Le plantéose est scindé en glucose et plantéobiose avec une très faible hydrolyse de ce plantéobiose.

Le lychnose est scindé en mélibiose et galactosido (1 → 1) fructose de façon moins sélective ; il y a déjà libération appréciable de galactose. (WICKSTRÖM et coll.)(44)

Avec les penta- et les hexasaccharides dérivant du lychnose et de l'isolychnose, la rupture de la liaison fructofuranosidique s'accompagne d'une scission plus marquée de liaisons galactopyranosidiques : WICKSTRÖM et coll. (46).

L'hydrolyse acide partielle de nos saccharides fournit un mélange de corps où prédomine nettement le mélibiose associé à divers saccharides qui furent identifiés à des galactosides du fructose.

Les faibles proportions de ces galactosides du fructose obtenus ne permettaient pas d'entreprendre leur isolement pour en établir la structure. Nous nous sommes bornés à vérifier que la scission des saccharides non réducteurs par hydrolyse acide modérée fournissait d'une part du mélibiose et d'autre part des galactosides du fructose ne renfermant pas de glucose. Dans ce cas, ces galactosides soumis à l'action de l' α -galactosidase du Café devaient être hydrolysés en galactose et fructose sans libérer de glucose (Tableau II).

Nous avons séparé le mélibiose et les galactosido-fructoses par chromatographie descendante sur papier en utilisant le solvant acide (p. 17) avec un développement de 2 jours à la température du laboratoire.

Le chromatogramme est découpé en bandes correspondant à chacun des galactosido-fructoses et au galactosido-glucose (mélibiose).

Après 3 extractions à l'eau froide, la solution aqueuse est évaporée à 50° et sous pression réduite. A chaque fraction on ajoute de l' α -galactosidase du Café.

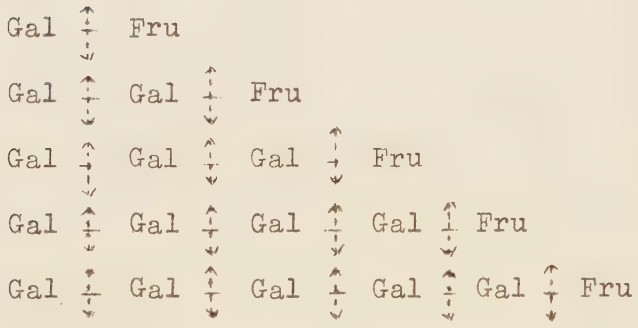
Après 48 heures à 37° et à pH 5, l'hydrolysat est neutralisé par du carbonate de baryum puis soumis à une chromatographie descendante sur papier avec le solvant acide antérieurement décrit (p. 17).

Le chromatogramme est révélé par la β-naphtylamine et le thymol (p. 17) et l'urée chlorhydrique (p. 19). L'hydrolyse α-galactosidasique n'a séparé comme hexoses que le galactose et le fructose à l'exclusion du glucose.

Les sucres obtenus sont indiqués dans le tableau (II).

TABLEAU II

L' α-GALACTOSIDASE DU CAFE DETACHE LE GALACTOSE TERMINAL



L'étude du galactosido-glucose séparé du galactosido-fructose nous a permis de l'identifier au mélibiose en préparant son osazone ; on dissout 0,237 mg de mélibiose dans 5 ml d'eau dist. puis on ajoute 0,237 ml de phénylhydrazine redistillée et 0,15 ml d'acide acétique. La solution est introduite dans une ampoule scellée et chauffée pendant 40 minutes au bain-marie bouillant. Après refroidissement, on recueille des cristaux. On recristallise la mélibiosazone dans l'alcool à 70°, P.F 185-187° - Aiguilles jaunes.

6 - HYDROLYSE PARTIELLE PAR LA β-FRUCTOFURANOSIDASE ET L' α-GALACTOSIDASE

i - Action de la β-fructofuranosidase

Nous soumettons ces corps à l'action d'un autolysat de levure de boulangerie préparé selon la technique de SUMNER et SOMERS (53). Après 48 heures de contact à 37° en présence de tampon acide acétique-soude de pH 5,0. I'hydrolysat est soumis à une chromatographie descendante sur papier avec le solvant acide (p. 17).

Le chromatogramme est révélé par la solution alcoolique de β-naphtylamine et thymol (p. 17).

Cet enzyme détache aisément le fructose terminal. C'est ainsi que dans les essais témoins le stachyose est aisement hydrolysé en fructose et manninotriose.

ii - Action de l'α -galactosidase

Nous avons étudié l'action d'une émulsine des graines de Café préparée selon la technique d'HELFRICH et WORSATZ (54).

Une solution aqueuse de chacun des sucres est additionnée de 1 ml d'une suspension à 0,2 p.100 d'émulsine de Café. Après 48 heures de contact à 37° en présence de tampon acide acétique-soude de pH 5,0., le produit de la réaction est soumis à la chromatographie sur papier selon le protocole déjà indiqué (p. 17).

Cet enzyme détache aisément le galactose terminal (Tableau II), nous observons sur les chromatogrammes la présence de galactose, de saccharose et des produits intermédiaires résultant de l'élimination d'une ou plusieurs molécules de galactose à partir de l'oligosaccharide initial.

7 - OXYDATION PERIODIQUE

Nous avons soumis chacun des sucres à l'oxydation par l'acide periodique (PI) (solution M/10 de periodate de sodium en milieu sulfurique). Cette oxydation est effectuée à l'obscurité à la glacière.

L'acide periodique non consommé est titré par la technique indirecte à As_2O_3 + IK ; nous calculons le nombre de molécules de PI réduit par une molécule de galactoside.

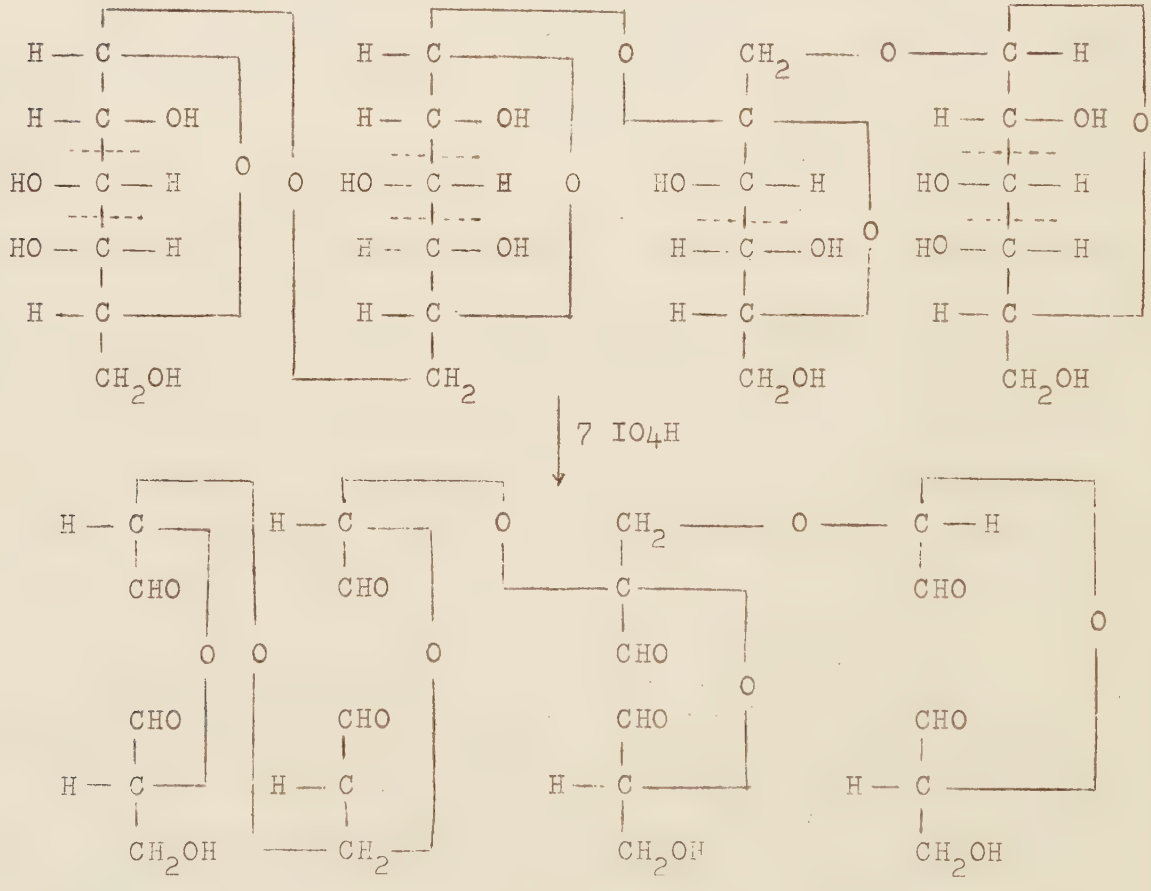
D'autre part, un titrage alcalimétrique après addition d'éthylène glycol permet de déterminer le nombre de molécules d'acide monovalent libéré (55) (56) (57) (58).

Nous comparons les conditions d'oxydation periodique sur le lychnose et l'isolychnose (schémas V et VI). Théoriquement, le lychnose réduit 2 mol. de PI par mol. d'aldohexose, le carbone 3 étant détaché sous forme d'acide formique ; le fructofuranose réduit une mol. de PI et il y a rupture de la liaison entre les carbones 3 et 4 ; ainsi au total le lychnose réduit sept mol. de PI selon le schéma (V).

L'isolychnose où le fructose est substitué en 3, réduit six mol. de PI selon le schéma (VI) et tous les deux produisent trois mol. d'acide formique. L'expérience se montre d'accord avec la théorie du mélange du lychnose et de l'isolychnose. On observe une réduction de 6.7. mol. d'acide periodique et une libération de 3 mol. d'acide formique. Ces deux données permettent de déterminer la proportion relative de chacun des deux tétrasaccharides.

SCHEMA V

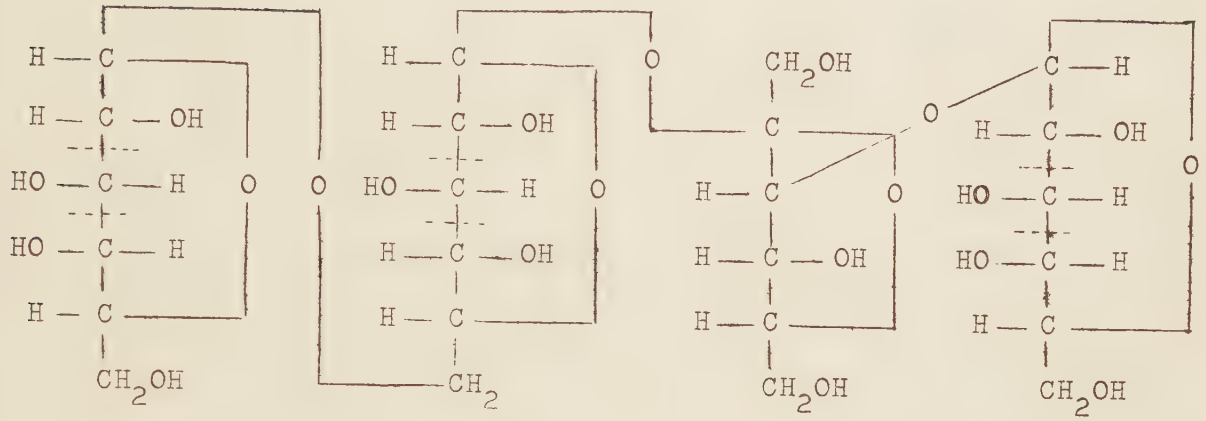
OXYDATION DU LYCHNOSE (I) PAR L'ACIDE PERIODIQUE



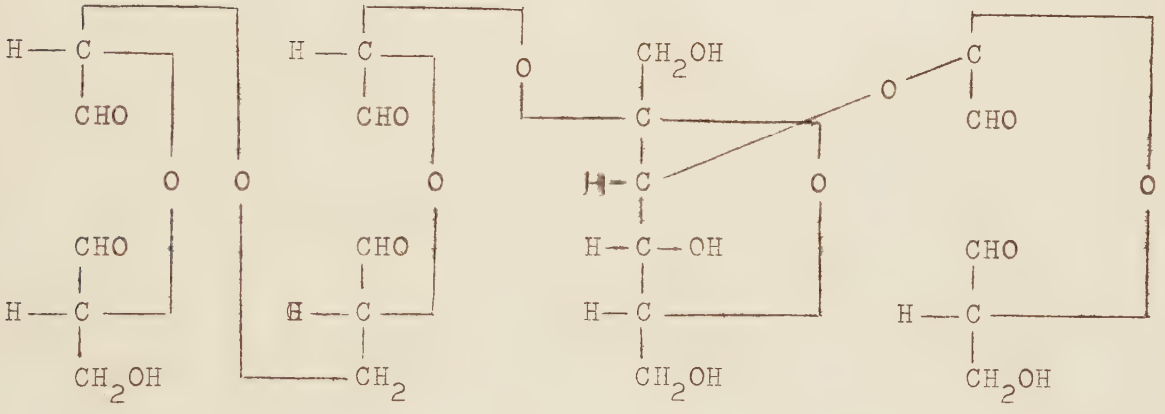
+ 3 H COOH + 7 IO_3H + 4 H_2O

SCHEMA VI

OXYDATION DE L'ISOLYCHNOSE (II) PAR L'ACIDE PERIODIQUE



6 IO_4H



+ 3 H COOH + 6 IO_3H + 3 H_2O

ETUDE DES PRODUITS d'OXYDATION PAR L'ACIDE PERIODIQUE

Principe -

RICHTMYER et HUDSON (59) ont montré que par oxydation du mélézitose par l'acide periodique, le fructose substitue en 1 et 3 n'était pas attaqué.

Le monogalactosido 3-F saccharose a la même structure générale que le mélézitose (mono glucosido-3-F saccharose), la seule différence entre les deux trisaccharides portant sur l'orientation des hydroxyles pour le carbone 4 de l'aldohexose lié en 3 au fructose. De ce fait les deux corps devraient être oxydés de façon similaire par l'acide periodique. Après oxydation puis hydrolyse, le fructose non attaqué demeure intact.

Nous avons recherché le fructose dans l'hydrolysat du tétraldéhyde (schéma VII, A), provenant de l'oxydation periodique du trisaccharide ; nous l'avons également recherché dans l'hydrolysat du tétracide (schéma VII, B) obtenu par oxydation bromée du tétraldéhyde. Pour les galactosides du saccharose l'essai fut réalisé sur le mélange impossible à fractionner des monagalactosido-3-F saccharose et monogalactosido-1-F saccharose.

Dans le monogalactosido 1-F saccharose, le fructose est attaqué par PI comme dans le lychnose, rupture entre les atomes de carbone 3 et 4 ; l'hexaldéhyde formé par oxydation periodique ne peut donc fournir de fructose par hydrolyse.

Technique opératoire -

50 mg du mélange des trisaccharides sont dissous dans 1 ml d'eau distillée. Nous ajoutons 10 ml d'acide periodique (solution $\frac{M}{10}$ de periodate de sodium en milieu sulfurique) et laissons en contact 4 jours à la glacière et dans l'obscurité. Nous neutralisons par l'eau de baryte et filtrons pour éliminer le précipité d'iodate et periodate de baryum.

Le filtrat est divisé en 3 parties :

1) L'une est acidifiée à pH 2.0 par l'acide sulfurique, introduite dans une ampoule qui est scellée, puis maintenue 3 heures dans un bain-marie bouillant. Après refroidissement l'on neutralise par le carbonate de baryum et filtre.

La chromatographie sur papier permet d'y déceler un corps migrant comme le fructose.

2) La seconde fraction est additionnée de 1 g de carbonate de baryum et 1,5 ml de brome. Nous laissons en contact 4 jours à la température du laboratoire en agitant fréquemment, filtrons, chassons le brome par un courant d'air sous pression réduite.

Nous acidifions par l'acide sulfurique à pH 2.0 et hydrolysons 3 heures au bain-marie bouillant, neutralisons par le carbonate de baryum.

Le filtrat soumis à la chromatographie descendante sur papier révèle un corps ayant la mobilité du fructose.

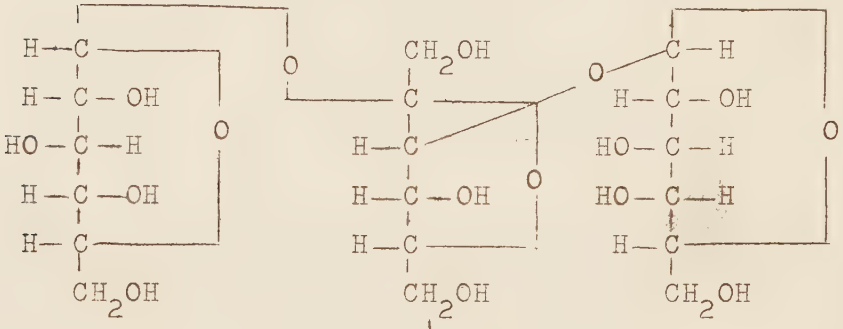
3) La troisième fraction est acidifiée par l'acide sulfurique et additionnée de 1,5 ml de brome. Après 4 jours nous hydrolysons comme dans l'opération précédente. L'hydrolysat permet également de déceler par chromatographie le fructose.

Ces opérations ont été réalisées parallèlement avec le mélézitose, l'hydrolysat du tétraldéhyde (schéma VII, A) formé par oxydation periodique (première fraction) et celui du tétracide (schéma VII, B), en derivant par oxydation bromée (deuxième et troisième fraction) contiennent du fructose. Les taches obtenues avec le fructose dérivant du mélézitose sont nettement plus colorées que celles obtenues à partir du mélange des monogalactosides du saccharose (1-F et 3-F) oxydés, puisque seul le dérivé 3-F pouvait donner du fructose après oxydation periodique puis hydrolyse.

SCHEMA VII

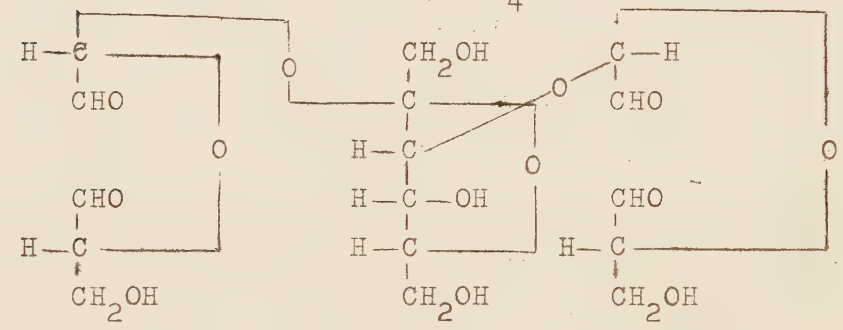
OXYDATION DU MELEZITOSE PAR L'ACIDE PERIODIQUE

PUIS PAR LE BROME



IO_4H

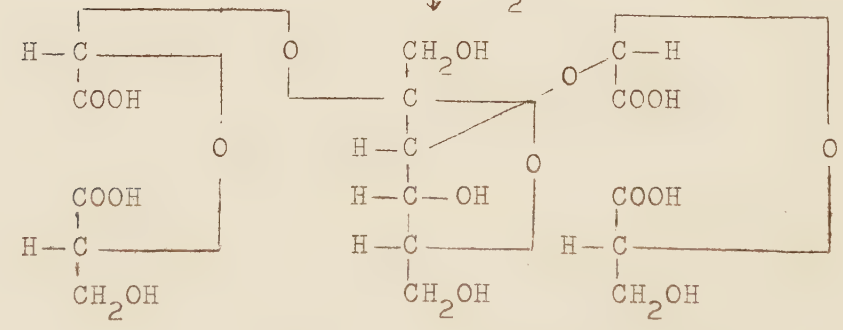
(A)



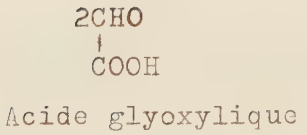
+ 2HCOOH

Br_2

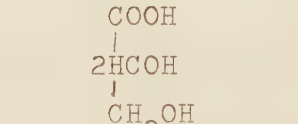
(B)



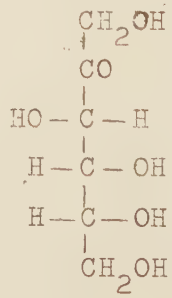
Hydrolyse à pH_2



Acide glyoxylique



Acide D-glycérique



D - Fructose

8 - METHYLATION COMPLETE PUIS HYDROLYSE

Nous avons suivi la technique mise au point par COURTOIS, Le DIZET et PETEK (48) et LAIDLOW et WYLAM (60) qui comporte les phases suivantes :

1) méthylation

2) hydrolyse du saccharide méthylé

3) identification des oses méthyles libérés par hydrolyse.

1) Méthylation

Une quantité comprise entre 50 et 150 mg de saccharides est dissoute dans 2 ml d'eau dist. et 2 ml de solution d'hydroxyde de sodium à 30 p.100. Nous ajoutons alors goutte à goutte et simultanément 4 ml de la même solution de soude et 3 ml de sulfate de méthyle pendant 1 heure avec agitation magnétique continuelle à la température du laboratoire ; l'agitation est ensuite maintenue pendant 6 heures. Nous laissons reposer pendant la nuit. Le lendemain, nous ajoutons 0,9 g de soude en pastilles et 2 ml de sulfate de méthyle et nous agitons encore 8 heures, laissons reposer pendant la nuit.

Le produit méthylé est extrait à 4 reprises par le chloroforme ; l'extrait chloroformique est lavé 3 fois avec de l'eau distillée puis déshydraté par le sulfate de sodium anhydre et enfin évaporé à sec sous pression réduite. Le résidu sirupeux jaunâtre est additionné de 1,5 g d'oxyde d'argent et 7 ml d'iodure de méthyle.

La réaction se poursuit pendant 6 heures à 45° sous reflux en agitant. Nous laissons reposer pendant la nuit, filtrons sur papier ; le filtrat lavé avec du chloroforme distillé est évaporé à sec sous pression réduite.

Le traitement par l'oxyde d'argent et l'iodure de méthyle est répété quatre fois.

Nous avons vérifié que ces holosides n'avaient pas été décomposés au cours de la méthylation en effectuant avant l'hydrolyse des holosides méthylés une chromatographie sur papier.

2) Hydrolyse du saccharide méthylé

Les saccharides complètement méthylés sont hydrolysés par l'acide sulfurique N/1 par chauffage pendant 6 heures au bain-marie bouillant. Après refroidissement, nous neutralisons par le carbonate de baryum et centrifugeons ; au surnageant nous ajoutons une petite quantité d'alcool à 95° pour éviter toute altération des solutions.

3) Identification des oses méthylés liberés par hydrolyse

Le liquide jaunâtre obtenu a été soumis à la chromatographie avec les deux solvants utilises régulièrement par WICKSTRÖM (59) que nous avons légèrement modifiés.

Ces solvants sont les suivants :

n-Butanol	50		Benzène	170	
Ethanol	10	en vol.	Ethanol	50	en vol.
Eau	40		Eau	8	

Chromatographie descendante sur papier Whatman N°1, pendant 18 heures à 18° - Révélation par chauffage à 110° avec l'oxalate d'urée et l'oxalate d'aniline.

Les compositions de ces révélateurs sont les suivantes :

oxalate d'aniline	n-Butanol	80 ml
	Ethanol	50
	Aniline	1
	2 g d'acide oxalique dans 40 ml d'eau	
oxalate d'urée	Acide oxalique et urée à saturation dans l'alcool à 50°.	

Les résultats figurent dans le tableau (III).
Les mobilités Rg sont exprimées par rapport à celle du tétraméthyl 2, 3, 4, 6 - glucose témoin ou present dans les hydrolysats du saccharose et du mélézitose méthylés.

TABLEAU III

ETUDE PAR CHROMATOGRAPHIE DESCENDANTE SUR PAPIER DES OSES METHYLES PRESENTS DANS L'HYDROLYSAT DU PRODUIT COMPLETEMENT METHYLE

	Système solvant n-Butanol / Ethanol / Eau 50 : 10 : 40 en vol.				Système solvant Benzène / Ethanol / Eau 170 : 50 : 8 en vol.			
Rangée des spots	Rg	Teinte	Rg	Teinte	Rg	Teinte	Rg	Teinte
Triméthyl 2-3-4 galactose	0,79	rouge-brunâtre			0,3	rouge-brunâtre		
Triméthyl 2-3-4 glucose	0,93	"			0,53	"		
Tétraméthyl 2-3-4-6 galactose	0,93	"			0,92	"		
Triméthyl 1-4-6 fructose			0,95	gris-verdâtre			0,8	gris-verdâtre
Triméthyl 3-4-6 fructose			0,80	"			0,41	"
	oxalate d'aniline		oxalate d'urée		oxalate d'aniline		oxalate d'urée	

Rg : Exprime la distance parcourue par rapport au cheminement du tétraméthyl 2-3-4-6 D-glucopyranose (Rg = 1.00)

DEUXIEME PARTIE

-:-

ETUDE DES HOLOSIDES DE RACINES DE CUCUBALUS BACCIFER

-:-

Nous avons entrepris l'étude des racines d'une plante de la tribu des Silénées ; le Cucubalus baccifer

Nous avons réussi à isoler des racines récoltées en mai 1957 au jardin des plantes de Paris du Museum National d'Histoire Naturelle et d'un autre lot récolté au jardin des Plantes en avril 1959, les mêmes fractions de penta-, hexa-, hepta- et octosaccharides. Chacune de ces fractions de saccharides est un mélange des deux isomères dérivant respectivement du lychnose (I) et de l'isolychnose (II). Les deux lots de racines diffèrent légèrement par les tri et tétrasaccharides isolés.

Comme trisaccharide, les racines de 57 n'ont permis de séparer que du raffinose ; celles de 59 contiennent en outre deux trisaccharides dérivant respectivement du lychnose et de l'isolychnose par élimination du galactose relié au glucose.

Les racines de 57 ont permis d'isoler un mélange de lychnose et isolychnose, auxquels s'adjoint en 59 du stachyose. Les échantillons de saccharides correspondants seront dénommés 57 ou 59.

La structure des divers saccharides a été établie en utilisant les techniques générales décrites précédemment.

CHAPITRE I

-:-

ETUDE DES TRISACCHARIDES

-:-

1) Les deux lots de racines ont fourni un corps non réducteur, ayant une mobilité par rapport au raffinose (R_{raf}) de 1.0 $(\alpha)_D^{20°}$ = + 111° (corps 57), + 97° (corps 59) (VIII) et (IX)

Les deux échantillons libèrent par hydrolyse acide glucose, galactose et fructose.

La fructosidase les hydrolyse totalement en fructose et mélibiose ; l'α-galactosidase les scinde en galactose et saccharose.

Le corps est identifiable au raffinose, trisaccharide déjà décelé dans plus de deux cents espèces végétales (1) et qui avait été également séparé des racines de Lychnis dioïca (15).

Le raffinose est le principal constituant de la fraction soluble dans l'alcool utilisé pour précipiter les autres oligosaccharides.

2) L'échantillon 59 a permis de séparer un produit très hygroscopique, non réducteur, $(\alpha)_D^{20°}$ = + 100°, se stabilisant à + 96° après deux nouvelles purifications. Il s'agit cependant d'un mélange de deux corps : l'un A (VIII) de R_{raf} = 1,09, l'autre B (IX) de R_{raf} = 1,16.

L'α D glucopyranosyl (1 → 2) β D fructofuranosyl (3 → 1) α D galactopyranoside obtenu par hydrolyse α-galactosidasique partielle des saccharides de la série de l'isolychnose présente avec le même solvant un R_{raf} de 1,10 (49). C'est ce corps qui paraît

bien constituer le trisaccharide B, A pouvant être considéré comme le corps isomère dérivant du lychnose :
∝ D glucopyranosyl (1 → 2) β D fructofuranosyl (6 → 1)
∝ D galactopyranoside.

Les propriétés de la fraction trisaccharidique isolée correspondent à ce que l'on peut prévoir pour un mélange des deux isomères où prédominerait la forme dérivant du lychnose.

(I) Hydrolyse totale et dosage des oses libérés

Après 3 heures à 100°, ces holosides sont complètement hydrolysés par l'acide sulfurique N/1, et la chromatographie sur papier indique que le fructose, le glucose et le galactose sont les seuls oses constitutifs de cette molécule.

Sur un échantillon de ces holosides, nous avons déterminé le rapport moléculaire galactose/glucose après hydrolyse ; pour une mol. de glucose, nous retrouvons dans trois essais 1,1 , 0,9 et 1,0 mol. de galactose (Tableau IV)

TABLEAU IV

Chromatogrammes	Glucose	Galactose	Rapport moléculaire galactose/glucose
Lot 1959 1	42 µg	42 µg	1,0
2	43	38	0,9
3	40	44	1,1

(2) Hydrolyse acide partielle

Après action de l'acide sulfurique 0,4 N, pendant 48 heures à 37°, nous avons décelé par chromatographie sur papier des taches de fructose et de mélibiose pour le raffinose, de glucose et de galactosido-fructose pour les trisaccharides (VIII) et (IX).

Nous avons séparé le mélibiose et le galactosido-fructose par chromatographie sur papier (Tableau I).

L' ∝-galactosidase du Café est très active sur la fraction galactosido-fructose ; après action enzymatique, le chromatogramme permet de déceler le fructose et le galactose ; il n'y a pas de glucose libéré (Tableau II).

(3) Hydrolyse enzymatique

i - Action de l'invertase

Après 48 heures à 37°, pH 5, la fructosidase de la levure demeure sans effet sur ces trisaccharides (VIII) et (IX).

ii - Action de l'∝-galactosidase

Après action de l' ∝ -galactosidase de Café sur les deux trisaccharides, la chromatographie sur papier nous a permis de caractériser deux corps migrant et se révélant comme le galactose et le saccharose (Tableau II).

(4) Oxydation periodique

Cette oxydation est réalisée à la glacière dans l'obscurité. Une mol. de trisaccharide réduit 4,2 mol. d'acide periodique en 7 J. et 4,7 mol. en 15 J.

A, où le fructose n'est pas substitué en 3 ou 4 doit réduire 5 mol. d'oxydant (Schéma V). Dans B, où le groupement ∝-glycol du fructofuranose est substitué en 3, la fraction fructose du trisaccharide n'est pas attaquée (Schéma VI).

A et B doivent libérer par oxydation periodique deux mol. d'acide formique provenant du carbone 3 de chacun des aldohexoses ; nous trouvons 2 mol. après 7 jours et 2,02 mol. après 15 jours.

(5) Méthylation complète puis hydrolyse

La méthylation des sucres est réalisée par traitements répétés avec le diméthylsulfate en présence de soude à 30 p.100, puis par l'action de l'iodure de méthyle en présence d'oxyde d'argent. Le produit final de la méthylation est un sirop jaunâtre. Les saccharides complètement méthylés sont hydrolysés par l'acide sulfurique N/1. L'hydrolysat est soumis à la chromatographie sur

papier avec les deux solvants déjà indiqués (page 30). On observe sur les chromatogrammes :

1) du tétraméthyl 2-3-4-6 glucose, 2) du tétraméthyl 2-3-4-6 galactose. Ces deux dérivés tétraméthylés donnent des taches de colorations sensiblement égales, ce qui tendrait à indiquer qu'ils sont présents en proportions équimoléculaires. 3) une plus faible proportion de triméthyl 3-4-6 fructose et 4) une proportion encore plus réduite de triméthyl 1-4-6 fructose.

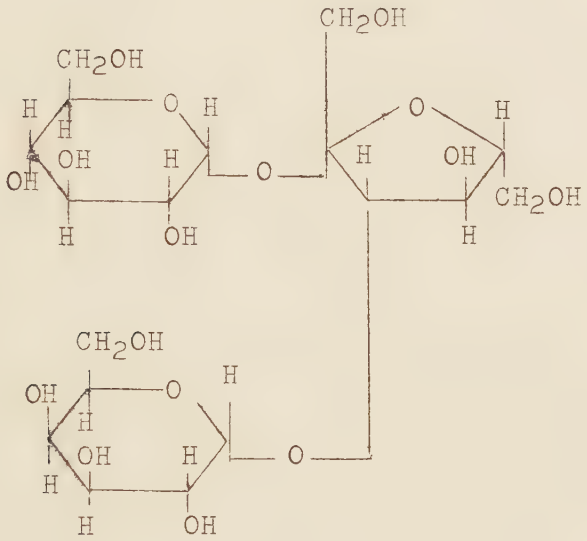
A et B conduisent aux mêmes dérivés tétraméthylés du galactose et du glucose. Par contre A substitué en 1 sur le fructose fournit le triméthyl 3-4-6 fructose tandis que B substitué en 3 sur le fructose fournit le triméthyl 1-4-6 fructose (Tableau III).

Les deux trisaccharides correspondant A au lychnose et B à l'isolychnose n'avaient pas encore été isolés directement à partir d'une plante. A n'avait même jamais été décrit, tandis que B avait été obtenu (49) après hydrolyse galactosidasique partielle de ses homologues supérieurs.

Les racines de Cucubalus renferment donc trois monogalactosides du saccharose : 1) Le raffinose ; α monogalactosido (6 G) saccharose largement distribué dans les végétaux 2) L'α monogalactosido (3 F) saccharose 3) L'α monogalactosido (I F) saccharose. Les deux derniers corps sont à notre connaissance décelés pour la première fois dans un végétal.

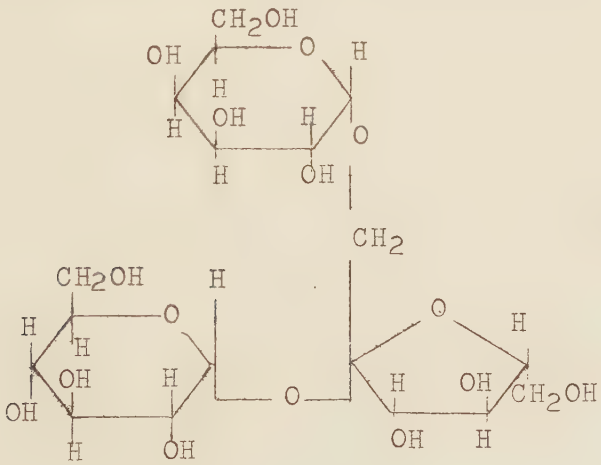
SCHEMA VIII (A)

TRISACCHARIDE DE LA SERIE DE L'ISOLYCHNOSE



SCHEMA IX (B)

TRISACCHARIDE DE LA SERIE DU LYCHNOSE



CHAPITRE II

-:-

ETUDE DES TETRASACCHARIDES

-:-

Les deux lots de racines ont donné des résultats légèrement différents.

Les racines de Cucubalus baccifer 1957 contiennent du lychnose (I) et de l'isolychnose (II) mais les racines de 1959 contiennent en outre un troisième tétrasaccharide identifié au stachyose. Le stachyose n'avait pas été observé dans les tétrasaccharides séparés du Lychnis dioïca. C'est par contre le tétrasaccharide le plus répandu chez les Végétaux.

1) Echantillon retiré des racines 57 -

Elles contiennent du lychnose et de l'isolychnose. Le corps obtenu est séparé par chromatographie en deux composés : l'un de R_{raf} = 0,711 analogue à celui du lychnose, l'autre de R_{raf} =0,811 analogue à celui de l'isolychnose (Tableau XV).

Une série de chromatographies et d'élutions ont permis de séparer le lychnose de l'isolychnose, mais ils ont été contaminés par des impuretés, car leurs pouvoirs rotatoires sont de $(\alpha)_D^{20°}$ = + 129° pour l'isolychnose et $(\alpha)_D^{20°}$ = + 136° pour le lychnose. Les échantillons de lychnose renfermant une faible quantité d'isolychnose obtenus à partir du Lychnis dioïca avaient en effet des $(\alpha)_D^{20°}$ = + 143,5° à + 155,3° (15) (43) (16) et de + 150° à + 155° (44) (Tableau XVI).

Les $(\alpha)_D$ du lychnose et de l'isolychnose sont vraisemblablement supérieurs à ceux fournis par les deux échantillons. La rotation plus élevée du lychnose correspond cependant au fait

que les saccharides isolés des racines de Lychnis récoltées en automne ont des $(\alpha)_D$ supérieurs à ceux des saccharides homologues des racines récoltées en juin où prédominent les dérivés de l'isolychnose.

Nous avons poursuivi nos essais avec le mélange des deux tétrasaccharides. Les résultats concordent avec ce que l'on peut prévoir pour un mélange de lychnose et d'isolychnose, avec prépondérance du premier. Le mélange n'est pas réducteur ; il n'est pas attaqué par la fructosidase ; l'α-galactosidase le scinde en galactose et saccharose ; il apparaît des trisaccharides intermédiaires ayant les mobilités des trisaccharides (Tableau XV) isolés du Cucubalus.

L'hydrolyse acide totale libère du glucose, du galactose et du fructose ; pour une mol. de glucose, nous trouvons 2,08 , 2,06 et 2,28 mol. de galactose (Tableau V).

TABLEAU V

	Chromatogrammes	Glucose	Galactose	Rapport moléculaire galactose/glucose
Lot 1957	1	100 µg	208 µg	2,08
	2	98	202	2,06
	3	96	220	2,28
Lot 1959	1	31	52	1,70
	2	25	53	2,10
	3	27	58	2,15

Après méthylation puis hydrolyse, nous avons identifié le tétraméthyl 2-3-4-6 galactose abondant, le triméthyl 2-3-4 glucose moins abondant, une moindre proportion de trimethyl 3-4-6 fructose et une plus faible proportion encore de triméthyl 1-4-6 fructose (Tableau III).

Une mol. du mélange des tétrasaccharides réduit 6,7 mol. d'acide periodique en 7 et 15 J. et 6,8 en 21 J. Il y a parallèlement libération de 2,8 mol. d'acide formique en 7 J. et 3 en 15 et 21 J.

Une mol. de lychnose réduit 7 mol. d'acide periodique et une mol. d'isolychnose 6, les deux corps libérant 3 mol. d'acide formique à partir des carbones 3 des trois aldohexoses. La quantité d'oxydant réduit indique une plus forte proportion de lychnose que d'isolychnose, ce qu'indiquait aussi la proportion plus grande du triméthyl fructose 3-4-6 que du 1-4-6.

2) Echantillon retiré des racines 59

Elles contiennent également 1) du lychnose (I) et 2) de l'isolychnose (II) mais en outre 3) un troisième tétrasaccharide identifié au stachyose et 4) des traces d'un autre tétrasaccharide non identifié.

La fraction des tétrasaccharides forme une substance blanche, non réductrice, dextrogyre $(\alpha)_D^{20°} = + 146,7°$. Par hydrolyse acide complète, elle fournit glucose, galactose et fructose. Les rapports moléculaires galactose/glucose trouvés sont 1,7 , 2,1 et 2,15 (Tableau V).

Un développement poussé des chromatogrammes sépare trois corps ayant des R_{raf} = 0,62 , 0,71 et 0,81, identiques respectivement à ceux du lychnose, de l'isolychnose et du stachyose. La tache correspondant au stachyose est la moins intense et celle du lychnose la plus colorée.

Une mol. du mélange des tétrasaccharides réduit 6,8 mol. d'acide periodique en 7 J., 6,9 en 15 J. et 7,0 en 21 J. Il s'est libéré 2,8 mol. d'acide formique en 7 J., 3,0 en 15 et 21 J.

Le stachyose, tout comme le lychnose, réduit 7 mol. d'oxydant en libérant 3 mol. d'acide formique.

L'α-galactosidase scinde le mélange des tétrasaccharides en galactose et saccharose ; les trisaccharides intermédiaires couvrent la zone correspondant aux corps A et B et au raffinose.

Tous ces résultats indiquent que trois digalactosidosaccharoses forment le mélange. La fraction tétrasaccharidique est attaquée par la fructosidase.

Le chromatogramme indique la présence de fructose, d'un corps ayant le R_{raf} du manninotriose et des taches conservant les R_{raf} du lychnose et de l'isolychnose (Tableau XV).

Après méthylation et hydrolyse, nous identifions les mêmes dérivés méthylés que pour la fraction de tétrasaccharides 57 ; nous trouvons deux corps supplémentaires ayant avec les deux systèmes solvants (p. 30) les mobilités du tétraméthyl 1-3-4-6 fructose et du triméthyl 2-3-4 galactose (Tableau VI) ; ces deux derniers dérivés sont les moins abondants, ils correspondent à un fructose terminal et un galactose intercalé entre deux autres hexoses. Ces faits et l'action de la fructosidase concordent pour identifier au stachyose le troisième tétrasaccharide.

TABLEAU VI

ETUDE PAR CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER DES OSES METHYLES PRESENTS DANS L'HYDROLYSAT DU STACHYOSE COMPLETEMENT METHYLE.

Rangée des spots	Système solvant Butanol 50 / Ethanol 10 / Eau 40 en vol.				Système solvant Benzène 170 / Ethanol 50 / Eau 8 en vol.			
	Rg	Teinte	Rg	Teinte	Rg	Teinte	Rg	Teinte
méthyl 2-3-4 D-galactose	0,79	rouge-brunâtre			0,3	rouge-brunâtre		
méthyl 2-3-4 D-glucose	0,93	"			0,53	"		
raméthyl 2-3-4-6 galactopyranose	0,93	"			0,92	"		
raméthyl 1-3-4-6 fructofuranose			1,0	gris-verdâtre			1,4	gris-verdâtre
	oxalate d'aniline		oxalate d'urée		oxalate d'aniline		oxalate d'urée	

Rg Exprime la distance parcourue par rapport au cheminement du tétraméthyl 2-3-4-6 D-glucopyranose (Rg = 1,00)

Alors que pour beaucoup d'autres plantes la voie métabolique normale consiste à allonger la chaîne d'unités galactose à partir du galactose du raffinose, dans le Cucubalus et le Lychnis l'allongement se fait à partir de la partie fructose du raffinose. Toutefois, dans le Cucubalus, l'allongement, s'il se fait de façon prépondérante sous les formes lychnose et isolychnose, ne se fait pas exclusivement de cette façon puisqu'il apparaît du stachyose. Il est permis de supposer que le stachyose dérive d'une voie secondaire pour les Caryophyllacées mais qui est préponderante dans les autres familles. Il serait intéressant de rechercher si, en sens inverse, les plantes à stachyose ne synthetisent pas par une voie secondaire pour elles une faible quantité de lychnose et d'isolychnose.

Dans les multiples plantes d'où le stachyose a été séparé sous forme cristallisée, le lychnose et l'isolychnose ont pu être éliminés lors des recristallisations. Par ailleurs les R_{raf} du lychnose et de l'isolychnose sont trop proches de celui du stachyose pour qu'ils aient pu être détachés par analyse chromatographique sur papier des extraits de plantes à stachyose.

-:-

CHAPITRE III

-:-

ETUDE DES OLIGOSACCHARIDES HOMOLOGUES SUPERIEURS DU LYCHNOSE ET DE L'ISOLYCHNOSE

-:-

Les fractions isolées des lots de racines 57 et 59 ont donné des résultats presque identiques. Ce sont toutes des substances blanches, amorphes, non réductrices. Elles paraissent toutes avoir des structures du même type. Chaque fraction renferme les deux isomères : 1) ceux dérivant du lychnose, du type général α D galactopyranosyl (1 → 6) α D glucopyranosyl (1 → 2) β D fructofuranosyl (1 → 1)$\left[\alpha \text{ D galactopyranosyl}\right]^{n}$ (6 → 1) α D galactopyranoside où n va de 1 (pentasaccharides (III) et (IV) à 4 (Octosaccharides : (X) et (XI).

2) ceux dérivant de l'isolychnose qui ne diffèrent des précédents que par une liaison (3 → 1) entre le fructose et le galactose.

Les deux séries dérivent des tétrasaccharides correspondants par adjonction d'une chaîne d'unités galactose reliées en (6 → 1) et comportant d'une à quatre mol. de galactose.

I - ETUDE DES PENTASACCHARIDES

Les pentasaccharides appartiennent aux séries du lychnose et de l'isolychnose. Ils sont identiques pour les lots 57 et 59. Le pentasaccharide de la série du lychnose est plus abondant que celui de la série de l'isolychnose.

1 - Mobilités par rapport au raffinose (R_{raf})

Les R_{raf} sont de 0,55 pour le pentasaccharide de la série

de l'isolychnose et 0,47 pour celui de la série du lychnose (Tableau XV).

2 - Pouvoirs rotatoires

Ces corps purent être desséchés comme les précédents en vue de la détermination de leurs pouvoirs rotatoires en solution aqueuse. Les pouvoirs rotatoires des pentasaccharides isolés à partir des racines du Cucubalus baccifer 1957 sont moins élevés que ceux des pentasaccharides de 1959.

Lot 1957 $(\alpha)_D^{20°}$ = + 142° A =+1,3° l = 0,5 C = 1,83 p.100

Lot 1959 $(\alpha)_D^{20°}$ = + 161° A =+1,3° l = 0,5 C = 1,62 p.100

3 - Hydrolyse totale et dosage des oses libérés

Ces pentasaccharides ont été soumis à l'action de l'acide sulfurique N/1, pendant 3 heures à 100° ; par chromatographie sur papier, nous avons pu identifier les oses libérés au fructose, au glucose et au galactose. Nous avons déterminé le rapport moléculaire galactose/glucose après hydrolyse acide totale ; pour une mol. de glucose, nous trouvons 3 molécules de galactose (théorie 3).

TABLEAU VII

	Chromatogrammes	Glucose	Galactose	Rapport moléculaire galactose/glucose
Lot 1957	1	37 µg	103 µg	2,78
	2	37	103	2,78
Lot 1959	1	44	132	3,00
	2	35	110	3,17
	3	48	128	2,66

4 - Hydrolyse acide partielle

Après action de l'acide sulfurique 0,4 N, pendant 2 jours à 37°, nous avons décelé par chromatographie sur papier des traces de galactose, de mélibiose et de digalactosido-fructose.

Nous avons sépare le mélibiose et le digalactosido-fructose par chromatographie sur papier.

Après 48 heures à 37° et à pH 5, l'action de l'α -galactosidase de Café est très active sur la fraction digalactosido-fructose ; le chromatogramme indique la présence de fructose, de galactose et de monogalactosido-fructose (Tableau I).

5 - Hydrolyse enzymatique

i - Action de l'invertase

Après 48 heures à 37°, pH 5, la fructosidase de la levure demeure sans effet sur ces holosides.

ii - Action de l'α -galactosidase

L'α -galactosidase de Café est très active sur ces pentasaccharides (Tableau II). Nous avons pu identifier sur les chromatogrammes du galactose, du saccharose, des trisaccharides ayant les mêmes R_{raf} que le monogalactosido-1-F saccharose (Schéma IX) et le monogalactosido-3-F-saccharose (Schéma VIII) et deux tétrasaccharides possédant les mobilités respectives du lychnose et de l'isolychnose.

6 - Oxydation periodique

Nous oxydons ces pentasaccharides selon le protocole habituel ; une molécule de penta-saccharide réduit 8,3 mol. d'acide periodique et au cours de l'oxydation de ce corps 4 mol. d'acide formique sont libérées (Tableau VIII). Les chiffres obtenus nous indiquent que ces corps sont oxydés selon les schémas V et VI.

TABLEAU VIII

OXYDATION PERIODIQUE DES PENTASACCHARIDES

	Mol.d'acide periodique réduit par mol. de saccharide			Mol. d'acide formique apparues par oxydation periodique d'une mol. de saccharide		
Durée de réaction en jours	7	15	21	7	15	21
Lot 1957	8,2	8,3	8,4	3,5	3,7	3,9
Lot 1959	8,1	8,2	8,4	3,5	3,7	4,05

7 - Méthylation complète et hydrolyse

Ces pentasaccharides sont méthylés complètement puis les produits méthylés sont hydrolysés par l'acide sulfurique N/1.

L'hydrolysat est soumis à la chromatographie sur papier avec les deux solvants (p. 30). Le chromatogramme indique les mêmes résultats pour les lots de racines de 57 et 59 : présence de tétraméthyl 2-3-4-6 galactose, de triméthyl 2-3-4-glucose, de triméthyl 2-3-4-galactose, de triméthyl 3-4-6 fructose et de triméthyl 1-4-6 fructose.

2 - ETUDE DES HEXASACCHARIDES

Les hexasaccharides appartiennent aux séries du lychnose et de l'isolychnose. L'hexasaccharide de la série du lychnose est plus abondant que celui de la série de l'isolychnose.

1 - Mobilités par rapport au raffinose (R_{raf})

Les R_{raf} sont de 0,38 pour l'hexasaccharide de la série de l'isolychnose et 0,31 pour celui de la série du lychnose (Tableau XV).

2 - Pouvoirs rotatoires

Ces corps furent desséchés comme les précédents et nous avons déterminé leurs pouvoirs rotatoires en solution aqueuse :

Lot 57 $(\alpha)_D^{20°} = +163°$ A = + 2,2° l = 0,5 C = 2,7 p.100

Lot 59 $(\alpha)_D^{20°} = +185°$ A = + 1,23° l = 0,5 C = 1,3 p.100

3 - Hydrolyse totale et dosage des oses libérés

Dans les mêmes conditions que précédemment, nous avons soumis les hexasaccharides à une hydrolyse acide prolongée ; le fructose, le glucose et le galactose ont ainsi été libérés. Nous avons déterminé après hydrolyse totale, les rapports moléculaires galactose/glucose : pour une mol. de glucose, nous trouvons 4 mol. de galactose (Théorie 4).

TABLEAU IX

	Chromatogrammes	Glucose	Galactose	Rapport moléculaire galactose/glucose
Lot 1957	1	128 µg	500 µg	3,90
	2	108	425	3,93
	3	110	438	3,98
Lot 1959	1	35	140	4,00
	2	32	136	4,20
	3	33	133	4,03

4 - Hydrolyse acide partielle

Après action de l'acide sulfurique 0,4 N, pendant 48 heures à 37°, le chromatogramme indique la presence de galactose, de mélibiose et des di- et tri galactosido-fructoses.

Nous avons séparé le mélibiose et les galactosido-fructoses par chromatographie sur papier. Après 48 heures à 37° et à pH 5, l'α -galactosidase de Café est très active sur la fraction des galactosido-fructoses ; le chromatogramme du produit réactionnel indique la présence de galactose et des mono et digalactosido-fructoses. Au cours de la réaction enzymatique, il pourrait être intéressant d'ajouter alors un peu d'α -galactosidase fraîche pour voir la liaison monogalactosido-fructose rompue.

5 - Hydrolyse enzymatique

i - Action de l'invertase

Après 48 heures de contact à pH 5 et à 37°, ces hexasaccharides ne sont pas touchés par la fructosidase de la levure.

ii - Action de l'α -galactosidase

L'α -galactosidase de Café est très active sur ces hexasaccharides. Nous avons pu identifier sur les chromatogrammes du galactose, du saccharose, des tri-, tétra-, et pentasaccharides ayant les mêmes R_{raf} que les mono-, di- et trigalactosido-1-F-saccharoses et les mono-, di- et trigalactosido-3-F saccharoses (Tableau II).

6 - Oxydation periodique

Nous avons soumis ces hexasaccharides à l'action de l'acide periodique selon le protocole utilisé pour l'oxydation periodique des tétra et des pentasaccharides.

Les chiffres obtenus nous indiquent que ces corps sont oxydés selon les schémas V et VI.

TABLEAU X

OXYDATION PERIODIQUE DES HEXASACCHARIDES

	Mol.d'acide periodique réduit par mol. de saccharide			Mol.d'acide formique apparues par oxydation periodique d'une mol.de saccharide.		
Durée de réaction en jours	7	15	21	7	15	21
Lot 1957	10,2	10,3	10,4	4,4	4,8	5,0
Lot 1959	10,1	10,4	10,4	4,3	4,7	5,05

7 - Méthylation complète et hydrolyse

Nous avons procédé à l'identification chromatographique des oses méthylés obtenus après méthylation complète puis hydrolyse.

Le chromatogramme indique de fortes proportions de tétraméthyl 2-3-4-6-galactose et de triméthyl-2-3-4-galactose, une quantité moins importante de triméthyl 2-3-4 glucose, une moindre encore de triméthyl 3-4-6-fructose qui prédomine sur le triméthyl 1-4-6-fructose. Nous avons obtenu les mêmes résultats pour les lots de racines de 1957 et 1959 (Tableau III).

3 - ETUDE DES HEPTASACCHARIDES

Les heptasaccharides appartiennent aux séries du lychnose (I) et de l'isolychnose (II).

L'heptasaccharide de la série du lychnose est plus abondant que celui de la série de l'isolychnose.

1 - Mobilités par rapport au raffinose (R_{raf})

Les R_{raf} sont de 0,27 pour l'heptasaccharide de la série de l'isolychnose et 0,21 pour celui de la série du lychnose (tableau XV).

2 - Pouvoirs rotatoires

Ces oligosaccharides sont desséchés selon le protocole de dessication décrit précédemment et nous avons déterminé leurs pouvoirs rotatoires en solution aqueuse.

Lot 1957 $(\alpha)_D^{20°} = +177°$ A = + 0,43 l = 0,5 C = 0,49 p.100

Lot 1959 $(\alpha)_D^{20°} = +201°$ A = + 1,08 l = 0,5 C = 1,08 p.100

3 - Hydrolyse totale et dosage des oses libérés

Ces heptasaccharides sont soumis à une hydrolyse acide totale en milieu sulfurique N/1.

La chromatographie sur papier de l'hydrolysat nous a permis

de caractériser le fructose, le glucose et le galactose.

Nous avons déterminé le rapport moléculaire galactose/glucose (1) après hydrolyse totale ; pour une mol. de glucose, nous trouvons 5 mol. de galactose (théorie 5).

TABLEAU XI

	Chromatogrammes	Glucose	Galactose	Rapport moléculaire galactose/glucose
Lot 1957	1.....	50 µg	248 µg	4,96
	2.....	46	245	5,32
	3.....	42	220	5,24
Lot 1959	1.....	33	150	4,54
	2.....	30	150	5,00
	3.....	27	138	5,10

4 - Hydrolyse acide partielle

Après action de l'acide sulfurique 0,4 N, pendant 48 heures à 37°, le chromatogramme indique la présence de galactose, de mélibiose et des di-, tri- et tétragalactosido-fructoses (Tableau I). Nous avons séparé le mélibiose et plusieurs galactosido-fructoses par chromatographie sur papier. A la fraction des galactosido-fructoses, nous avons ajouté une petite quantité d' α-galactosidase de Café ; après 48 heures à 37° et à pH 5, le chromatogramme indique la présence de corps présentant les mobilités respectives du galactose et des mono-, di- et trigalactosido-fructoses obtenus par hydrolyse acide partielle des homologues inférieurs des séries du lychnose et de l'isolychnose.

5 - Hydrolyse enzymatique

i - Action de l'invertase

Après 48 heures de contact à pH 5 et 37°, ces heptasaccharides ne sont pas hydrolysés par la fructosidase de la levure.

ii - Action de l'α -galactosidase

Après 48 heures à 37° et à pH 5, l'action de l' α -galactosidase de Café sur ces heptasaccharides (Tableau I), nous a permis d'identifier par la chromatographie sur papier 6 corps migrant respectivement comme le galactose, le saccharose, les tri-, tétra-, penta-, et hexasaccharides décrits dans les précédents chapitres (tableau II).

6 - Oxydation periodique

Nous oxydons ces heptasaccharides selon le protocole indiqué précédemment.

Les chiffres obtenus nous indiquent que ces corps sont oxydés selon les schémas V et VI avec réduction de 12,4 mol. de PI, apparition de 6 mol. d'acide formique. (Tableau XII).

TABLEAU XII

OXYDATION PERIODIQUE DES HEPTASACCHARIDES

	Mol.d'acide periodique réduit par mol. de saccharide			Mol.d'acide formique apparues par oxydation periodique d'une mol.de saccharide		
Durée de réaction en jours	7	15	21	7	15	21
Lot 1957	12,1	12,2	12,3	5,3	5,9	6,02
Lot 1959	11,8	12,4	12,4	5,3	5,9	6,03

7 - Méthylation complète et hydrolyse

Ces heptasaccharides sont méthylés complètement puis les produits méthylés sont hydrolysés par l'acide sulfurique N/1.

Le chromatogramme indique une forte proportion de tétraméthyl 2-3-4-6-galactose et une proportion encore plus importante de triméthyl 2-3-4 galactose, et une quantité moindre de triméthyl 2-3-4-glucose, de triméthyl 3-4-6 fructose et de triméthyl 1-4-6 fructose. Nous avons obtenu les mêmes résultats pour les lots de

racines de 1957 et 1959 (Tableau III).

4 - ETUDE DES OCTOSACCHARIDES

Les octosaccharides (X et XI) appartiennent aux séries du lychnose et de l'isolychnose. L'octosaccharide de la série du lychnose est plus abondant que celui de la série de l'isolychnose. Les structures sont identiques pour les lots 57 et 59.

1 - Mobilités par rapport au raffinose (R_{raf})

Les R_{raf} sont de 0,15 pour l'octosaccharide de la série de l'isolychnose et 0,09 pour celui de la série du lychnose (Tableau XV).

2 - Pouvoirs rotatoires

Comme pour les sucres précédents, les pouvoirs rotatoires des octosaccharides ont été déterminés après dessiccation complète des oligosaccharides et dissolution dans l'eau distillée.

Lot 1957 $(\alpha)_D^{20°} = + 200°$ A = + 0,2° l = 0,5 C = 0,20 p.100

Lot 1959 $(\alpha)_D^{20°} = + 222°$ A = + 0,92° l = 0,5 C = 0,82 p.100

3 - Hydrolyse totale et dosage des oses libérés

Après 3 heures à 100°, ces holosides sont complètement hydrolysés par l'acide sulfurique N/1, et la chromatographie sur papier indique la presence de fructose, glucose et galactose.

Nous avons déterminé le rapport moléculaire galactose/ glucose (1) après hydrolyse acide totale pour une mol. de glucose, nous trouvons 6 mol. de galactose (théorie 6).

TABLEAU XIII

	Chromatogrammes	Glucose	Galactose	Rapport moléculaire galactose/glucose
Lot 1957	1.....	32,5 µg	198 µg	6,09
	2.....	35	200	5,71
	3.....	30	180	6,00
Lot 1959	1.....	25	148	5,92
	2.....	23	132	5,74

4 - Hydrolyse acide partielle

Après action de l'acide sulfurique 0,4 N, pendant 48 heures à 37°, le chromatogramme indique la présence de galactose, de mélibiose et des di-, tri-, tétra- et pentagalactosido-fructoses (Tableau I). Nous avons séparé le mélibiose et les galactosido-fructoses par chromatographie sur papier. La fraction des galactosido-fructoses est attaquée par l'α-galactosidase. Après 48 heures de contact à pH 5 et à 37°, le chromatogramme indique la présence de galactose, des mono-, di-, tri- et tétragalactosido-fructoses (Tableau II).

5 - Hydrolyse enzymatique

i - Action de l'invertase

Après 48 heures à 37° et à pH 5, la fructosidase de la levure demeure sans effet sur ces holosides.

ii - Action de l'α-galactosidase

Après 48 heures à 37° et à pH 5, l'action de l'α-galactosidase de Café sur ces holosides nous a permis d'identifier par chromatographie sur papier 7 corps migrant respectivement comme le galactose, le saccharose, le tri- le tétra-, le penta-, l'hexa- et l'heptasaccharide.

5 - Oxydation periodique

Nous oxydons ces octosaccharides selon le protocole indiqué précédemment.

Les chiffres obtenus nous indiquent que ces corps sont oxydés selon les schémas V et VI ; réduction de 14,3 mol. de PI ; apparition de 7 mol. d'acide formique (tableau XIV).

TABLEAU XIV

OXYDATION PERIODIQUE DES OCTOSACCHARIDES

	Mol.d'acide periodique réduit par mol. de saccharide			Mol.d'acide formique apparues par oxydation periodique d'une mol. de saccharide		
Durée de réaction en jours	7	15	21	7	15	21
Lot 1957	13,8	14,2	14,3	6,4	6,8	6,9
Lot 1959	14,0	14,2	14,3	6,4	6,8	6,9

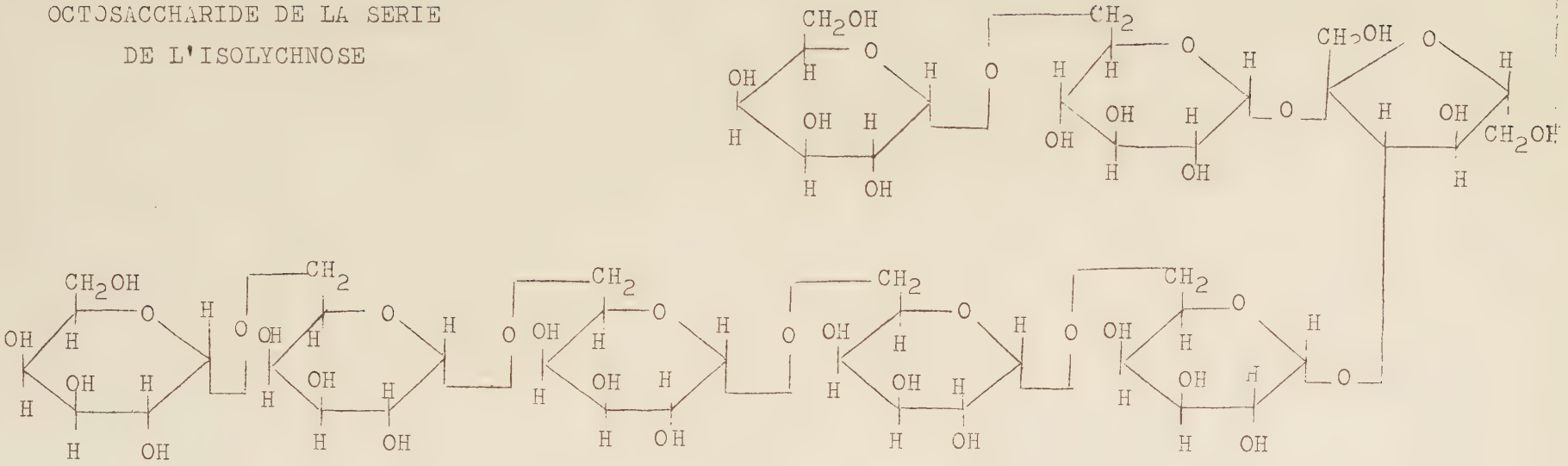
6 - Méthylation complète et hydrolyse

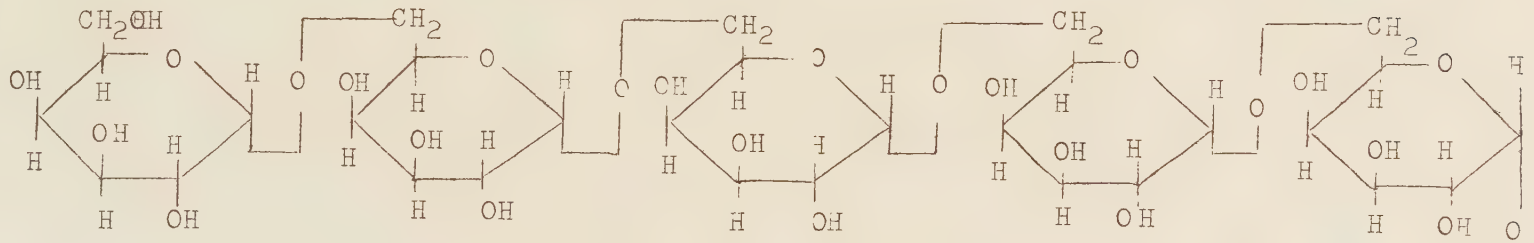
Ces octosaccharides sont méthylés complètement, puis les produits méthylés sont hydrolysés par l'acide sulfurique N/1.

Le chromatogramme indique les mêmes résultats que ceux obtenus avec l'hydrolysat des Penta-, hexa-, et heptasaccharides méthylés complètement. Une forte proportion de tétraméthyl 2-3-4-6-galactose, et une proportion encore plus importante de triméthyl 2-3-4 galactose et une quantité moindre de trimethyl 2-3-4 glucose, de triméthyl 3-4-6 fructose et de triméthyl 1-4-6 fructose (Tableau III).

SCHEMA X

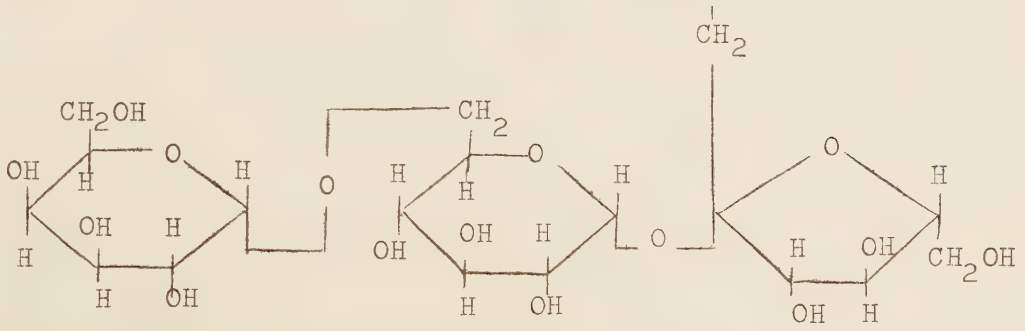
OCTOSACCHARIDE DE LA SERIE
DE L'ISOLYCHNOSE





SCHEMA XI

OCTOSACCHARIDE DE LA SERIE
DU LYCHNOSE



TROISIEME PARTIE

-:-

ETUDE DES HOLOSIDES DE RACINES DE DIANTHUS CARYOPHYLLUS VAR.BLANCHE ET VAR.ROUGE

-:-

Comme matière première, nous nous sommes adressée à des racines récoltées au mois de novembre 1959 à Brévannes. L'un des lots venait de plantes ayant fourni des fleurs blanches, l'autre d'oeillets à fleurs rouges. Chacun des deux lots fut traité indépendamment ; les racines des variétés à fleurs blanches et à fleurs rouges se sont révélées avoir sensiblement la même composition. Nous avons réussi à isoler des extraits alcooliques des holosides non réducteurs fournissant après hydrolyse totale du fructose, du glucose et à l'exception du diholoside du galactose. Les corps séparés des deux variétés sont les suivants :

1) un diholoside migrant et se révélant à la chromatographie sur papier comme le saccharose.

2) des trisaccharides identiques à ceux des racines de Cucubalus baccifer 1959 ; le raffinose et les trisaccharides (VIII et IX) de la série du lychnose et de l'isolychnose.

3) Des tétrasaccharides identiques à ceux des racines de Cucubalus baccifer 1957 ; le lychnose (I) et l'isolychnose (II)

4) Des penta- (III) et (IV), des hexa-, des hepta- et des octosaccharides (X) et (XI) de R raf identiques à ceux des corps correspondants de la série de deux lots de Cucubalus baccifer mais ils en diffèrent par leurs pouvoirs rotatoires (Tableau XVI), le rendement (Tableau XVII) et la mobilité chromatographique (Tableau XV).

Nous présentons sous forme de tableau comparatif les résultats obtenus pour les 4 végétaux.

1 - Mobilité par chromatographie

Nous avons comparé la vitesse de migration de chacun des saccharides à celle du raffinose en utilisant un papier Arches 304 ; nous opérons par chromatographie descendante avec le mélange solvant acide décrit (p. 17), température 18°, durée de contact 3 jours (Tableau XV).

Les oligosaccharides des racines d'oeillet ont sensiblement la même mobilité chromatographique que ceux des racines de Cucubalus. Pour un même saccharide, les écarts entre les R_{raf} des variétés d'oeillet blanc et rouge sont du même ordre qu'entre les R_{raf} des deux variétés d'oeillet et du Cucubalus. Les différences de mobilité entre deux isomères relevant respectivement des séries du lychnose et de l'isolychnose demeurent assez constantes quels que soient le poids moléculaire de l'oligosaccharide et la racine dont il a été retiré.

TABLEAU XV

MOBILITES PAR RAPPORT AU RAFFINOSE (R_{raf})
DES DIVERS OLIGOSACCHARIDES

		Cucubalus baccifer lot 1959	Dianthus var.blanche	Dianthus var.rouge
Tri	Série de l'isolychnose	1,16	1,10	1,10
	Série du lychnose	1,10	1,05	1,01
Tétra	Isolychnose	0,71	0,74	0,72
	Lychnose	0,62	0,65	0,64
Penta	Série de l'isolychnose	0,55	0,54	0,55
	Série du lychnose	0,47	0,49	0,49
Hexa	Série de l'isolychnose	0,38	0,40	0,37
	Série du lychnose	0,31	0,33	0,32
Hepta	Série de l'isolychnose	0,27	0,27	0,28
	Série du lychnose	0,21	0,23	0,21
Octo	Série de l'isolychnose	0,15	0,18	0,16
	Série du lychnose	0,09	0,12	0,11

Fig. 1 Chromatogramme des holosides Papier Arches 304
Chromatographie descendante de 3 jours à 18°

——— Série de l'isolychnose

——— Série du lychnose

2 - Pouvoirs rotatoires (Tableau XVI)

Les pouvoirs rotatoires des oligosaccharides extraits des trois racines manifestent des écarts assez accentués ; ceci tient au fait qu'ils sont constitués par des mélanges en proportions variables du dérivé du lychnose et de son isomère dérivant de l'isolychnose. Les dérivés du lychnose prédominent dans les oligosaccharides isolés des racines d'automne du Lychnis dioïca (42) (43) (44) (47).

Ces oligosaccharides ont un pouvoir rotatoire plus élevé que les corps correspondants extraits des racines de Lychnis récoltées au printemps ou en juin, échantillons où prédominent les dérivés de l'isolychnose. En particulier le pouvoir rotatoire des holosides obtenus à partir des racines de Cucubalus baccifer 1957 est moins élevé que celui des 3 autres lots.

Les rotations différentes obtenues avec les saccharides de même poids moléculaire extraits des diverses racines correspondent sans doute à des proportions différentes des deux isomères associés, ces proportions pouvant varier selon les espèces et pour une même espèce selon l'époque de la végétation (Lychnis dioïca et Cucubalus).

TABLEAU XVI

VALEUR DES ROTATIONS OPTIQUES DES OLIGOSACCHARIDES

(I) ARCHAMBAULT (A) (16)

(II) COURTOIS (J.E.) et coll. (42) (43) (44) (45) (46) (48)

(III) COURTOIS (J.E.) et ARIYOSHI (U) (47)

(IV) COURTOIS (J.E.) et ARIYOSHI (U) (Recherches non publiées)

	Racines de Lychnis dioïca (I)		Racines de Lychnis dioïca (II)		Racines de Cucubalus baccifer (III)		Racines de Dianthus (novembre) (IV	
	juin	oct.	juin	oct.	1957 mai	1959 avril	Var. blanche	Var. rouge
Trisaccharides	-	+122,6	-	-	+111°	+96,6	+99°	+110°
Tétrasaccharides	+153,5°	+155°	+154,5°	+151,3°	iso +129° Lych +136°	+147°	+144,2°	+147°
Pentasaccharides	+165,1°	+180,4°	+165°	+180,4°	+142°	+161°	+164°	+166,
Hexasaccharides	+173,6°	+185,3°	+169°	+185,3°	+163°	+185,4°	+172°	+175°
Heptasaccharides	-	-	+182°	-	+177°	+201°	+188°	+191°
Octosaccharides	-	-	-	-	+200°	+222°	+199°	+201°

3 - Rendement en oligosaccharides

Les méthodes que nous avons décrites pour l'extraction des holosides et pour leur fractionnement par passage sur colonne et par chromatographie sur papier nous ont donné relativement aux rendements les chiffres consignés dans le tableau (XVII).

Il est à remarquer que la variété rouge d'oeillet a fourni des rendements plus élevés que la variété blanche.

TABLEAU XVII

RENDEMENTS EN OLIGOSACCHARIDES A PARTIR DES RACINES DE 4 VEGETAUX ; CES CHIFFRES CORRESPONDENT A 1 kg DE RACINES

	Cucubalus baccifer 1957	Cucubalus baccifer 1959	Dianthus var. blanche	Dianthus var. rouge
	g	g	g	g
Trisaccharides	-	0,63	0,09	0,08
Tétrasaccharides	0,30	0,53	0,88	1,56
Pentasaccharides	0,74	1,38	0,25	0,75
Hexasaccharides	0,74	1,51	0,18	1,33
Heptasaccharides	0,46	1,45	0,20	0,80
Octosaccharides	0,18	0,15	0,11	0,22

CHAPITRE I

-:-

ETUDE DES TRISACCHARIDES

-:-

Nous avons isolé à partir des racines de Dianthus var.blanche et var.rouge trois trisaccharides : le raffinose, un trisaccharide de la série du lychnose et un trisaccharide de la série de l'isolychnose.

1 - Pouvoirs réducteurs

Aucun des trois trisaccharides ne réduit la liqueur de Fehling.

2 - Pouvoirs rotatoires

En 1959, COURTOIS, Le DIZET et PETEK (48) avaient obtenu par hydrolyse ménagée un trisaccharide identifié à un monogalactosido-3-F-saccharose.

Ils ont trouvé pour le pouvoir rotatoire de ce trisaccharide la valeur $(\alpha)_D$ = + 25°. Le corps que nous avons préparé est un mélange de trois trisaccharides ; les pouvoirs rotatoires de ce mélange dépendent donc des proportions relatives des 3 trisaccharides qu'il renferme.

Nous avons déterminé le pouvoir rotatoire en solution aqueuse de deux échantillons obtenus au cours d'opérations de purification distinctes.

Lot : var.blanche $(\alpha)_D^{18°}$ = 99° A = + 0,63° l = 0,5 C = 1,28 p.100

Lot : var.rouge $(\alpha)_D^{23°}$ = 110° A = + 0,5° l = 0,5 C = 0,906 p.100

3 - Hydrolyse totale et dosage des oses libérés

Après 3 heures à 100°, ces holosides sont complètement hydrolysés par l'acide sulfurique N/1 et la chromatographie sur papier indique que le fructose, le glucose, et le galactose sont les seuls oses constitutifs de cette molécule.

Sur un échantillon nous avons déterminé le rapport moléculaire galactose/glucose (1) après hydrolyse : pour une mol. de glucose nous trouvons une mol. de galactose (Théorie I).

TABLEAU XVIII

	Chromatogrammes	Glucose	Galactose	Rapport moleculaire galactose/glucose
Lot var. blanche	1	40 µg	40 µg	1,00
	2	45	43	0,96
	3	38	42	1,10
Lot var. rouge	1	32	34	1,06
	2	30	32	1,06
	3	35	37	1,05

4 - Hydrolyse acide partielle

Après action de l'acide sulfurique 0,4 N pendant 48 heures à 37°, nous avons décelé par chromatographie sur papier, des traces de fructose et de mélibiose correspondant au raffinose, de glucose et de galactosido-fructose pour les trisaccharides des séries du lychnose et de l'isolychnose (Tableau I).

Nous avons séparé le mélibiose et le galactosido-fructose par chromatographie sur papier. L'α -galactosidase du Café est très active sur la fraction galactosidofructose ; après action enzymatique, le chromatogramme permet de déceler le fructose et le galactose (Tableau II).

5 - Hydrolyse enzymatique

i - Action de l'invertase

Le raffinose est hydrolysé par la fructosidase de la levure et après chromatographie de l'hydrolysat, il apparaît deux substances identiques aux produits obtenus par hydrolyse acide partielle de ce même corps : le fructose et le mélibiose.

ii - Action de l'α -galactosidase

Après action de l'α -galactosidase de Café sur le mélange des trois trisaccharides, la chromatographie sur papier nous a permis de caractériser deux corps migrant et se révélant comme le galactose et le saccharose (Tableau II).

6 - Oxydation periodique

Cette oxydation réalisée à la glacière dans l'obscurité nous fournit des résultats identiques aux trisaccharides de Cucubalus baccifer. (Tableau XIX)

TABLEAU XIX

OXYDATION PERIODIQUE DU MELANGE DE TRISACCHARIDES

	Mol.d'acide periodique réduit par mol. de saccharide			Mol.d'acide formique apparues par oxydation periodique d'une mol. de saccharide		
Durée de réaction en jours	7	15	21	7	15	21
Lot : var.blanche	4,5	4,7	5,3	2,0	2,02	2,05
Lot : var.rouge	4,5	4,6	5,2	2,0	2,02	2,04

7 - Méthylation complète et hydrolyse

Ces trisaccharides sont méthylés complètement puis les produits méthylés sont hydrolysés par l'acide sulfurique N/1.

Nous avons identifié le tétraméthyl 2-3-4-6-galactose présent en quantité abondante, le tétraméthyl 2-3-4-6 glucose, le tri-

méthyl 3-4-6-fructose et le triméthyl 1-4-6 fructose ; en outre apparaissent deux corps supplémentaires ayant avec les deux systèmes solvants (p. 30) les mobilités du tétraméthyl 1-3-4-6 fructose et du triméthyl 2-3-4 glucose. Ces deux derniers dérivés correspondent à un fructose terminal et à un galactose terminal.
Ces faits rapprochés des resultats obtenus par l'action de la fructosidase concordent pour caractériser le raffinose.

-:-

CHAPITRE II

-:-

ETUDE DES TETRASACCHARIDES

-:-

Les racines de Dianthus Caryophyllus var.blanche et var. rouge contiennent du lychnose et de l'isolychnose (I) et (II) comme les racines de Cucubalus baccifer 1957 et de Lychnis dioïca.

Nous avons réalisé nos essais avec le mélange des deux tétrasaccharides.

1 - Pouvoirs réducteurs

Le mélange n'est pas réducteur.

2 - Pouvoirs rotatoires

Nous avons desséché ces sucres de 100 à 110° sous vide jusqu'à poids constant , puis déterminé le pouvoir rotatoire en solution aqueuse.

Lot : var.blanche $(\alpha)_D^{20°} = +144,2°$ A = 0,97 l= 0,5 C =1,34 p.100

Lot : var.rouge $(\alpha)_D^{20°} = +147°$ A = 1,66 l= 0,5 C = 2,26 p.100

3 - Hydrolyse totale et dosage des oses libérés

Après 3 heures à 100°, ces holosides sont complètement hydrolysés par l'acide sulfurique N/1. La chromatographie sur papier des produits de l'hydrolysat nous a permis de caractériser trois oses migrant respectivement comme le fructose, le glucose et le galactose. Nous avons déterminé après hydrolyse totale les rapports moléculaires galactose/glucose (I) ; pour une mol. de glucose nous trouvons deux mol. de galactose (Théorie 2).

TABLEAU XX

	Chromatogrammes	Glucose	Galactose	Rapport moléculaire galactose/glucose
Lot var. blanche	1	92 µg	159 µg	1,72
	2	86	162	1,88
	3	97	192	1,98
Lot var. rouge	1	35	72	2,05
	2	37	70	1,89

4 - Hydrolyse acide partielle

Nous avons soumis ces tétrasaccharides à l'action de l'acide sulfurique 0,4 N pendant 48 heures à 37°.

Les chromatogrammes de l'hydrolysat nous indiquent la présence de galactose, de mélibiose et de monogalactosido-fructose (tableau I). Nous avons séparé le mélibiose et le monogalactosidofructose par la chromatographie sur papier. Après 48 heures à 37° et à pH 5, l'action de l'α-galactosidase de Café sur ce galactosidofructose nous a permis de caractériser par chromatographie sur papier deux corps migrant comme le fructose et le galactose (tableau II).

5 - Hydrolyse enzymatique

i - Action de l'invertase

Ces tétrasaccharides ne sont pas attaqués par la fructosidase.

ii - Action de l'α-galactosidase

Après 48 heures à 37° et à pH 5, l'action de l'α-galactosidase de Café sur ces tétrasaccharides nous a permis d'identifier par chromatographie sur papier deux corps migrant respectivement comme le galactose et le saccharose (Tableau II).

6 - Oxydation periodique

Une mol. de lychnose réduit 7 mol. d'acide periodique et

une mol. d'isolychnose 6 ; les deux corps libèrent 3 mol. d'acide formique à partir des carbones 3 des trois aldohexoses. La quantité d'oxydant réduit indique une plus forte proportion de lychnose que d'isolychnose.(Tableau XXI)

TABLEAU XXI

OXYDATION PERIODIQUE DE TETRASACCHARIDES

	Mol.d'acide periodique réduit par mol. de saccharide			Mol.d'acide formique apparues par oxydation periodique d'une mol. de saccharide		
Durée de réaction en jours	7	15	21	7	15	21
Lot : var.blanche	6,4	6,9	7,0	2,8	3,0	3,2
Lot : var. rouge	6,4	6,7	7,2	2,8	3,0	3,0

7 - Méthylation complète et hydrolyse

Les tétrasaccharides sont méthylés complètement puis les produits méthylés sont hydrolysés par l'acide sulfurique N/1 ; l'hydrolysat est soumis à la chromatographie sur papier avec les deux solvants.(p. 30)

Nous avons identifié le tétraméthyl 2-3-4-6 galactose abondant, le triméthyl 2-3-4 glucose moins abondant, une moindre proportion de triméthyl 3-4-6 fructose et une plus faible proportion encore de triméthyl 1-4-6 fructose (Tableau III).

-:-

CHAPITRE III

-:-

ETUDE DES HOMOLOGUES SUPERIEURS

-:-

Les fractions isolées des lots de racines de Dianthus Caryophyllus var.blanche et var.rouge ont donné des résultats presque identiques. Dans le tableau XIII, nous avons réuni les résultats des principales déterminations effectuées sur les deux lots. Ce sont toutes des substances blanches, non réductrices, libérant par hydrolyse acide totale 1 mol. de glucose, 1 mol. de fructose et 3 à 6 mol. de galactose (Tableau XXII). Elles paraissent toutes avoir des structures du même type. Chaque fraction renferme les deux isomères : 1) la série du lychnose (I), 2) la série de l'isolychnose (II). Les deux séries dérivent des tétrasaccharides correspondants par adjonction d'une chaîne d'unités galactose reliées en (6 → 1) et comportant une à quatre mol. de galactose.

Les faits concordant avec une telle structure sont les suivants :

Pour chaque fraction de saccharides une chromatographie sur papier de longue durée permet de différencier deux constituants.

1 - Pouvoirs rotatoires

Les $(\alpha)_D$ dextrogyres augmentent régulièrement avec le poids moléculaire, et par le fait avec le nombre de mol. de galactose. Ceciindique que la mol. de galactose adjointe à l'homologue inférieur est sous forme α (Tableau XVI).

2 - Hydrolyse acide partielle

L'hydrolyse par l'acide sulfurique 0,4 N à 37° pendant 48 heures a scindé les penta-, hexa-, hepta- et octosaccharides en une

série de corps séparés par chromatographie sur papier. La révélation indique la présence avec tous les saccharides:(Tableau I)

1) d'une tache plus ou moins intense ayant la mobilité du galactose ;
2) d'une tache très nette d'un corps ayant le même Rf que le mélibiose témoin ;
3) d'une série de taches moins mobiles dont le nombre croît du penta- à l'hexasaccharide. Les bandes correspondant à cette troisième série de taches sont découpées et extraites par l'eau. Elles sont alors additionnées d'α -galactosidase de Café. Après 24-48 heures à 37° nous soumettons à la chromatographie sur papier dans les conditions habituelles les divers produits réactionnels. (Tableau II).

Les produits dérivant des quatre oligosaccharides ont fourni des résultats identiques ; les seuls hexoses libérés sont le galactose et le fructose ; l'hydrolyse enzymatique n'a pas libéré de glucose qui aurait été formé à partir d'un galactosido-glucose.

Il apparaît donc que l'hydrolyse acide partielle a scindé la liaison fructofuranosidique des saccharides pour fournir d'une part du mélibiose, d'autre part des galactosido-fructoses ayant d'une à cinq mol. de galactose.

La chaîne d'unités galactose paraît donc bien se greffer sur le fructose du saccharose.

3 - Hydrolyse enzymatique

i - Action de l'invertase

Le fructose occupe une position centrale car aucune des fractions saccharidiques ne libère de fructose par contact avec la fructosidase.

ii - Action de l'α -galactosidase

Les mol. de galactose sont placées aux deux extrémités de la mol. de saccharose. L'α -galactosidase du Café en libère du galactose et il apparaît du saccharose après hydrolyse prolongée ;

les corps intermédiaires de la réaction présentent les Rf des homologues inférieurs.

C'est ainsi que l'octosaccharide permet de déceler sur les chromatogrammes des taches ayant les mêmes Rf que les hepta- , hexa-, penta-, tétra- et trisaccharides, le saccharose et le galactose (Tableau II).

4 - Oxydation periodique

Après oxydation par l'acide periodique il apparaît une mol. d'acide formique par mol. d'aldohexose présent. Ceci tend à indiquer que pour chaque aldohexose les hydroxyles supportés par les atomes de carbone 2, 3 et 4 ne sont pas substitués : l'on peut en déduire que les associations d'aldohexoses se font en (1 → 6).

La quantité d'acide periodique réduit est supérieure à celle consommée par l'oxydation des aldohexoses combinés (2 mol. pour une mol. d'aldohexopyranoside). L'excédent est de 0,4 à 0,6 mol. d'acide periodique par molécule d'oligosaccharide : ceci indique qu'une partie du fructose des saccharides est attaquée par l'acide periodique entre les atomes de carbone 3 et 4. La fraction du fructose non attaquée est donc substituée en 3 ou 4. (Schémas V et VI).

5 - Méthylation complète et hydrolyse

Après méthylation puis hydrolyse il a été possible d'identifier (Tableau III) : 1) du tétraméthyl 2-3-4-6-galactose
2) du triméthyl 2-3-4 glucose. Les intensités de ces deux taches n'augmentent pas lorsque le poids moléculaire du saccharide croît.
3) du triméthyl 2-3-4 galactose. La surface et l'intensité de la tache s'accroissent régulièrement du pentasaccharide à l'octosaccharide, les mol. supplémentaires de galactose sont donc reliées en (6 → 1).
4) du triméthyl 3-4-6 fructose et 5) une tache un peu moins grise que la précédente avec l'urée chlorhydrique ; cette tache présente la mobilité du triméthyl 1-4-6 fructose.

Dans chaque fraction la proportion du saccharide dérivant du lychnose paraît être supérieure à celle du saccharide isomère dérivant de l'isolychnose.

Il n'a pas été observé de taches correspondant à d'autres dérivés méthylés du glucose, du galactose ou du fructose. L'absence de dérivés diméthylés indique que la chaîne d'hexoses n'est pas ramifiée.

TABLEAU XXII

PROPRIETES DES FRACTIONS PENTA- A OCTOSACCHARIDES SEPAREES DES LOTS DE RACINES DE DIANTHUS VAR.BLANCHE ET VAR.ROUGE

Fraction d'oligosaccharides	Rapport moléculaire galactose/glucose (1)	Mol.d'acide periodique réduit par mol. de saccharide			Mol.d'acide formique apparues par oxydation periodique d'une mol. de saccharide		
		7 J.	15 J.	21 J.	7 J.	15 J.	21 J.
Pentasaccharides	3,0	8,3	8,7	8,9	3,7	3,85	4,2
Hexasaccharides	3,8	10,4	10,7	10,9	4,3	4,8	5,1
Heptasaccharides	4,8	11,9	12,4	12,7	5,3	5,9	6,03
Octosaccharides	5,7	13,7	14,0	14,3	6,2	6,7	6,9
Pentasaccharides	3,0	8,3	8,7	8,9	3,7	3,9	4,1
Hexasaccharides	4,0	10,4	10,7	10,8	4,5	4,8	5,1
Heptasaccharides	5,0	11,9	12,7	12,9	5,3	5,9	6,07
Octosaccharides	5,7	13,8	14,0	14,3	6,2	6,8	7,01

DISCUSSION DES RESULTATS

-:-

Dans l'ensemble, les saccharides séparés des racines de Cucubalus baccifer et de Dianthus var.blanche et var.rouge sont identiques aux galactosides des séries du lychnose et de l'isolychnose extraits des racines de Lychnis dioïca. La série de saccharides extraits du Cucubalus et des Dianthus var.blanche et var. rouge est même plus complète qu'à partir du Lychnis ; les racines de Lychnis récoltées en avril avaient permis d'isoler une fraction heptasaccharidique où prédominait très fortement l'isomère de la série de l'isolychnose. Il n'avait pas été séparé d'octosaccharides du Lychnis ; toutefois, il a été montré récemment (61) que ces racines renfermaient des homologues supérieurs de l'heptasaccharide avec de 8 jusqu'à 12, sinon 14 unités d'hexoses associées, mais ces saccharides n'ont pu être séparés par fractionnement. Les racines de Cucubalus et de Dianthus renferment un corps ou un mélange de corps migrant plus lentement que les octosaccharides, qui paraît être un nonasaccharide mais qui n'a pu être isolé. Il n'est pas exclu que des homologues supérieurs, peu solubles dans l'alcool, aient pu être extraits par le traitement alcoolique des racines de Cucubalus et de Dianthus : de tels homologues ont été extraits par l'eau sur le résidu après épuisement par l'alcool des racines de Lychnis.

Les racines de Cucubalus et de Dianthus des quatre lots ont fourni sensiblement les mêmes corps ; la seule différence notable porte sur l'identification du stachyose parmi les tétrasaccharides du lot de Cucubalus 59. Le stachyose est d'ailleurs peu abondant et il a fort bien pu être éliminé lors de la purification des tétrasaccharides du lot de Cucubalus 57 et les deux lots de racines d'oeillet.

Les racines de Cucubalus et de Dianthus ont ainsi permis de séparer deux séries enchevêtrées d'oligosaccharides isomères, les uns dérivant du lychnose, les autres de l'isolychnose. Cet enchevêtrement est plus accentué que pour le Lychnis où selon la période de végétation une des séries prédomine sur l'autre. Il convient cependant de noter que les deux lots de Cucubalus ont été récoltés au printemps et les deux lots de Dianthus en novembre, ce qui ne permet pas de faire de comparaisons plus poussées avec les Lychnis dont les racines ont été étudiées en avril, juin et octobre.

Il n'en demeure pas moins que les racines de trois espèces de la tribu des Silénées renferment les mêmes galactosides du saccharose appartenant à deux types différents. Cette hétérogénéité s'oppose à la présence d'autres galactosides, ceux de la série stachyose-verbascose, dans un nombre varié de familles botaniques : Légumineuses, Scrofulariacées, Labiacées entre autres (1). Ainsi dans de multiples plantes il n'a été identifié qu'un type de galactosides : Stachyose, verbascose et homologues supérieurs. Dans les trois Silénées au contraire la particularité biochimique paraît être non seulement la présence de galactosides du saccharose d'un type différent de la série stachyose-verbascose, mais encore la coexistence de deux séries de galactosides, celles du lychnose et de l'isolychnose. Devant les problèmes complexes que posent ces résultats nos informations sont encore bien trop restreintes pour que l'on puisse faire plus de commentaires et encore moins chercher à proposer des interprétations prématurées.

-:-

R E S U M E

-:-

Au cours de ce travail, nous nous sommes proposée d'étudier les galactosides du saccharose des racines de deux Silénées ; Cucubalus baccifer récoltées au printemps, Dianthus Caryophyllus var.blanche et var.rouge en novembre.

Nous avons précisé les structures de ces holosides qui appartiennent aux séries du lychnose et de l'isolychnose isolés à partir des racines de Lychnis dioïca par COURTOIS (J.E.) et ses coll. qui ont déterminé leur structure et les ont dénommés. Ces tétrasaccharides avaient été isolés des racines d'une Caryophyllacée ; le Melandrium album par MEYER (A) (40) mais depuis 70 ans leur structure n'avait pu être établie.

Dans les oligosaccharides, une à six molécules de galactose sont reliées à une molécule de saccharose. Chacune des fractions isolées de saccharides de même composition globale contient associés deux isomères dérivant respectivement du lychnose et de l'isolychnose. Pour la détermination des structures des oligosaccharides, nous avons tout d'abord procédé à leur isolement à partir des racines des deux Silénées par chromatographie sur colonne de charbon puis chromatographie sur papier. Avec l'aide de la chromatographie sur papier, nous avons pu obtenir de rapides et précieux renseignements sur les divers constituants glucidiques.

Il nous a été permis d'isoler des tri-, tétra-, penta-, hexa-, hepta- et octosaccharides. Nous avons étudié : 1) la vitesse de migration de chacun des saccharides par rapport à celle du raffinose (R_{raf} : Tableau XIV) par chromatographie sur papier.
2) le pouvoir réducteur -

3) le pouvoir rotatoire (tableau XVI) - 4) l'hydrolyse acide totale suivie du dosage des oses libérés ; une mol. de glucose, une de fructose et plusieurs mol. de galactose correspondent à chacun des oligosaccharides - 5) l'hydrolyse partielle par l'acide sulfurique 0,4 N ; les liaisons furanosidiques sont plus aisément hydrolysables. La scission des saccharides fournissait d'une part du mélibiose et d'autre part des galactosides du fructose ne renfermant pas de glucose (Tableau I) -

6) l'action de la fructosidase de la levure sans effet sur les oligosaccharides -

7) l'hydrolyse complète par l'α-galactosidase du Café ; il se forme du galactose et du saccharose (Tableau II) -

8) l'oxydation par l'acide periodique (PI) : une mol. de lychnose réduit sept mol. PI (schéma V) ; une mol. d'isolychnose réduit six mol. PI (schéma VI), toutes les deux libérant trois mol. d'acide formique.

9) la méthylation complète suivie de l'hydrolyse des saccharides méthylés et de l'identification des oses méthylés libérés par hydrolyse (Tableau III).

Les résultats obtenus ci-dessus indiquent la structure générale suivante pour ces galactosides du saccharose :

$$\left[\alpha\ \underline{D}\text{ galactopyranosyl } (1 \rightarrow 6)\right]^{n} \alpha\ \underline{D}\text{ glucopyranosyl } (1 \rightarrow 2)$$
$$\beta\ \underline{D}\text{ fructofuranosyl } (x\text{-}1)\ \left[\alpha\ \underline{D}\text{ galactopyranosyl } (6 \rightarrow 1)\right]^{n'}$$
$$\alpha\ \underline{D}\text{ galactopyranoside.}$$

$n = 0$ pour les trisaccharides
$n = 1$ pour les homologues supérieurs
$n' = 0$ pour les tri et tétrasaccharides
$n' = 1$ à 4 pour les homologues supérieurs.
$x = 1$ pour les dérivés du lychnose
$x = 3$ pour ceux de l'isolychnose

Les racines du Cucubalus baccifer renferment en outre du saccharose, du raffinose et pour l'un des lots une faible proportion de stachyose.

BIBLIOGRAPHIE

-:-

(1) COURTOIS (J.E.) Les Oligosaccharides non réducteurs contenant du galactose.
Edit Pergaman press- Londres 1959

(2) HERISSEY (H.), FLEURY (P.), WICKSTRÖM (A.), COURTOIS (J.E.) et Le DIZET (P.)
Bull.Soc.Chim.Biol. 1954, 35, 1507

(3) HERISSEY (H.), WICKSTRÖM (A) et COURTOIS (J.E.)
Bull.Soc.Chim.Biol. 1952, 34, 856

(4) COURTOIS (J.E.), WICKSTRÖM (A) et Le DIZET (P.)
Bull.Soc.Chim.Biol. 1952, 34, 1121

(5) COURTOIS (J.E.), WICKSTRÖM (A) et Le DIZET (P.)
Bull.Soc.Chim.Biol. 1953, 35, 1111

(6) COURTOIS (J.E.), WICKSTRÖM (A) et Le DIZET (P.)
Bull.Soc.Chim.Biol. 1953, 35, 1117

(7) LAIDLAW (R.A.) et WYLAM (C.B.)
J.Chem.Soc, 1953, 567

(8) FRENCH (D.), WILD (G.M.) et JAMES (W.J.)
J. Amer.Chem.Soc. 1953, 75, 3664

(9) HERISSEY (H.), FLEURY (P.), WICKSTRÖM (A.), COURTOIS (J.E.) et Le DIZET (P.) Bull.Soc.Chim.Biol. 1954, 36, 1519

(10) COURTOIS (J.E.), WICKSTRÖM (A), FLEURY (P.) et Le DIZET (P)
Bull.Soc.Chim.Biol.1955, 37, 1009

(11) MURAKAMI (S.) Proceed Imp.Acad.Tokyo , 1940, 16, 12.

(12) MURAKAMI (S.) Acta phytochimica, 1940, 11, 213

(13) MITRA (A.K.) et PERLIN (A.S.) Canad.J.Chem. 1957, 35, 1079.

(14) FRENCH (D.) Advanc. carbohydrate chem. 1954, 9, 149

(15) ARCHAMBAULT (A.), COURTOIS (J.E.), WICKSTRÖM (A.) et Le DIZET (P.) Bull.Soc.Chim.Biol. 1956, 38, 1121.

(16) ARCHAMBAULT (A.) Th.Doct.Univ.Pharm.Paris 1956

(17) COURTOIS (J.E.), ANAGNOSTOPOULOS (C.) et PETEK (F.) Enzymologia 1954, 17, 69

(18) DUPERON (R.) C.R. Acad.Sci.Paris, 1955, 241, 1817

(19) WATTIEZ (N.) et HANS (M.) Bull.Acad.Roy.Med.Belg. 1943, 8, 386

(20) FRENCH (D.), WILD (G.M.), YOUNG (B.) et JAMES (W.J.) J.Amer.Chem.Soc. 1953, 75, 709

(21) FRENCH (D.) J.Amer.Chem.Soc. 1955, 77, 1024

(22) CERBULIS (J.) Arch.Biochem.Biophys. 1955, 58, 406

(23) HERISSEY (H.) Bull.Soc.Chim.Biol. 1957, 39, 1553

(24) BOERHEIM SVENDSEN (B.) Zur chemie Norwigischer imb. Th.univ.Oslo 1954

(25) BOERHEIM SVENDSEN (A.) Medd.Norsk Form.Selsk 1958, 20

(26) WICKSTRÖM (A.) et BOERHEIM SVENDSEN (A) Acta chem. Scand. 1956, 10, 1199

(27) HERISSEY (H.), FLEURY (P.), WICKSTRÖM (A), COURTOIS (J.E.) et Le DIZET (P.) Bull.Soc.Chim.Biol. 1954, 36, 1507

(28) WILD (G.M.) et FRENCH (D.) Proc.Iowa, Acad.Sci. 1952, 59 226.

(29) HATTORI (S.) et SHIROYA (T) Arch.Biochem.Biophys. 1951, 34, 121.

(30) Du MERAC (M.L.) Bull.Soc.Bot.Franc. 1956, 103, 444

(31) ARCHAMBAULT (A.) Ann.Pharm.Franc. 1956, 14, 541.

(32) ONUKI (M.) Sci.Inst.Phys.Chem.Res.Tokyo 1932, 18, 357 et 1933, 20 , 201.

(33) BOURQUELOT (E.) et BRIDEL (M.) J.Pharm.Chim. 1910, 2, 481.

(34) COURTOIS (J.E.), ARCHAMBAULT (A.) et Le DIZET (P.) Bull.Soc.Chim. Biol. 1956, 38, 351.

(35) FRENCH (D.) et WILD (G.M.) J.Amer.Chem.Soc. 1953, 75, 2612

(36) MURAKAMI (S.) Acta phytochim. 1941, 12, 97

(37) COURTOIS (J.E.), ARCHAMBAULT (A.) et Le DIZET (P.)
Bull.Soc.Chim.Biol. 1956, 38, 359

(38) COURTOIS (J.E.), ARCHAMBAULT (A.) et Le DIZET (P.)
Bull.Soc.Chim.Biol. 1956, 38, 1117

(39) COURTOIS (J.E.), DILLEMANN (G.) et Le DIZET (P.)
Ann.Pharm.Franc. 1960, 18, 17.

(40) MEYER (A.) Ber.Deutsch.Chem.Gesell 1884, 17, 685

(41) NETIEN (G.) Th.Doct.Sc.Lyon 1935.

(42) ARCHAMBAULT (A.), COURTOIS (J.E.), WICKSTRÖM (A.) et Le DIZET (P.)
Bull.Soc.Chim.Biol. 1956, 38, 1121.

(43) ARCHAMBAULT (A.), COURTOIS (J.E.), WICKSTRÖM (A.) et Le DIZET (P.)
Bull.Soc.Chim.Biol. 1956, 38, 1133

(44) WICKSTRÖM (A.), COURTOIS (J.E.), Le DIZET (P.) et ARCHAMBAULT (A.)
Bull.Soc.Chim.France, 1958, 1410

(45) COURTOIS (J.E.), Le DIZET (P.) et WICKSTRÖM (A.)
Bull.Soc.Chim.Biol. 1958, 40, 1059

(46) WICKSTRÖM (A.), COURTOIS (J.E.), Le DIZET (P.) et ARCHAMBAULT (A.)
Bull.Soc.Chim.France 1959, 871

(47) COURTOIS (J.E.) et ARIYOSHI (U) ;
Bull.Soc.Chim.Biol. 1960, 42, 737

(48) COURTOIS (J.E.), Le DIZET (P.) et PETEK (F.)
Bull.Soc.Chim.Biol. 1959, 41, 1261

(49) HATANAKA (S.) Archiv.Biochem.Biophy. 1959, 82, 188

(50) NELSON (N.) J.Biol.Chem.1944, 153, 375

(51) SOMOGYI (M.) J.Biol.Chem.1945, 160, 61

(52) LAIDLAW et REID Nature 1950 166 476

(53) SUMNER (J.B.) et SOMERS (G.F.) Laboratory experiments in biological chemistry ; Academic press. New-York 1949.

(54) HELFRICH (B.) et WORSATZ (E.) Z.Physiol.Chem. 1935, 237, 254.

(55) LANGE (J.) Th.Doct.Univ.Pharm.Paris 1933

(56) BIEDER (A.) Th.Doct.Univ.Pharm.Paris 1954

(57) COURTOIS (J.E.) et WICKSTRÖM (A.) Bull.Soc.Chim.Biol. 1950, 32, 759.

(58) HERISSEY (H.), WICKSTRÖM (A.) et COURTOIS (J.E.) Bull.Soc.Chim.Biol.1951, 33, 642 et 1952, 34, 856

(59) RICHTMYER (K.) et HUDSON (C.S.) J.Org.Chem.1946, 11, 610.

(60) LAIDLAW (R.A.) et WYLAM (C.B.) J.Chem.Soc.1953, 567

(61) COURTOIS (J.E.), Le DIZET (P.) et DAVY (J.) Bull.Soc.Chim.Biol. 1960, 42, 351.

-:-

TABLE DES MATIERES

-:-

Pages

Introduction 1

PREMIERE PARTIE

Chapitre I - GENERALITES SUR LES OLIGOSACCHARIDES DES LYCHNIS DIOÏCA 5

Chapitre II - TECHNIQUES GENERALES I3

1) Isolement et purification des holosides I3

2) Fractionnement par passage sur colonne de charbon et par chromatographie sur papier I4

Chapitre III - TECHNIQUES D'ANALYSE I7

1) Mobilité par chromatographie I7

2) Pouvoir réducteur I8

3) Pouvoir rotatoire I8

4) Hydrolyse acide totale et dosage des oses libérés I8

5) Hydrolyse acide partielle I9

6) Hydrolyse partielle par l'invertase et l'α-galactosidase 22

7) Oxydation periodique 23

8) Méthylation complète puis hydrolyse 29

DEUXIEME PARTIE

ETUDE DES HOLOSIDES DE RACINES DE CUCUBALUS BACCIFER 33

Chapitre I - ETUDE DES TRISACCHARIDES 35

Chapitre II - ETUDE DES TETRASACCHARIDES 41

Chapitre III - ETUDE DES OLIGOSACCHARIDES HOMOLOGUES SUPERIEURS DU LYCHNOSE ET DE L'ISOLYCHNOSE 47

1) Etude des pentasaccharides 47
2) Etude des hexasaccharides 50
3) Etude des heptasaccharides 53
4) Etude des octosaccharides 56

TROISIEME PARTIE

ETUDE DES HOLOSIDES DE RACINES DE DIANTHUS VAR. BLANCHE ET VAR. ROUGE 61

Chapitre I - ETUDE DES TRISACCHARIDES 69

Chapitre II - ETUDE DES TETRASACCHARIDES 73

Chapitre III - ETUDE DES HOMOLOGUES SUPERIEURS 77

Discussion des résultats 83

Résumé 85

Bibliographie 87